



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2007년08월02일
<i>C12N 15/64</i> (2006.01)	(11) 등록번호	10-0745833
<i>C12N 15/63</i> (2006.01)	(24) 등록일자	2007년07월27일

(21) 출원번호	10-2006-0021024	(65) 공개번호
(22) 출원일자	2006년03월06일	(43) 공개일자
심사청구일자	2006년03월06일	

(73) 특허권자	고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자	오유경 서울특별시 도봉구 도봉동 삼환아파트 4동 405호 노상명 서울 강동구 성내2동 112-55
(74) 대리인	윤여강 이문섭

(56) 선행기술조사문헌	
JP17287507 A	JP2005287507 A
US5858784 A	US6020457 A

심사관 : 김기연

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체 조성물

(57) 요약

본 발명은 외래 유전자의 세포 내 발현 증강을 위한 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체 조성물에 관한 것으로, 상 세하게는 입자경 0.5-10 nm 범위의 양이온성 골드 나노입자와 목적하는 외래 유전자의 복합체를 다양한 세포에 처리하여 이로부터 목적하는 외래 유전자의 발현을 증진시키는 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체는 적절한 조성비를 통해서 목적하는 유전자를 세포 내로 수송하는 효율 및 유전자의 세포 내 발현량을 현저히 증강시킬 수 있을 뿐 아니라 세포 독성을 감소시킴으로써 세포 내 외래 유전자의 발현을 증강시키는 목적으로 유용하게 사용 가능할 것이다.

대표도

도 5

특허청구의 범위

청구항 1.

0.5-10 나노미터 크기의 입자경을 갖는 라이신(lysine) 잔기가 부착된 골드입자(nanogold)와 외래 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터가 1600:1 ~ 3200:1의 몰수 비율로 혼합되어 이루어진 복합체를 함유하는 동물세포 내 외래 유전자 전달용 조성물.

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

삭제

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 외래 유전자의 세포 내 발현 증강을 위한 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 평균 크기 0.5-10 nm의 양이온성 골드 나노입자와 목적하는 외래 유전자의 복합체를 다양한 세포에 처리하여 이로부터 목적하는 외래 유전자의 발현을 증진시키는 조성물에 관한 것이다.

양이온성 나노입자나 양이온성 고분자들은 구조적인 특징에 의한 양하전으로 유전자의 음이온성 하전과 결합하여 복합체를 형성하는 특징이 있어 유전자 전달체로서 연구되어 왔다. 이러한 합성 물질을 이용한 유전자 전달 방법은 렌티바이러스나 아데노 바이러스 등을 사용한 바이러스성 유전자 수송체에 비하여 제조방법이 간편하고, 전달하려는 유전자의 크기가 제한을 받지 않으며, 바이러스 캡시드 단백질에 의한 반복투여시의 면역부작용이 적으며, 바이러스 자체가 소유하는 유전자에 의한 체내 안전성 문제가 제기되지 않으며, 제조 비용 및 시간에 있어서도 상업적으로 유리한 장점이 있다. 한편 양이온성 물질을 이용한 유전자 전달방법 중 양이온성 인지질 수송체의 경우 인지질 조성에 양하전의 지질을 일정 비율로 혼합하여 양이온성 리포솜(cationic liposome)과 같은 나노 크기의 입자를 제조하고 이 입자를 유전자와 혼합하여 양하전 인지질 입자와 유전자의 복합체를 세포주들에 처리하여 유전자의 발현을 증강시키는 방법이 사용되어 왔다(미국특허 제 5,858,784호). 양이온성 고분자의 경우 DEAE dextran, 라이신 아미노산이 반복되는 구조의 폴리라이신, 에틸렌이민이 반복되는 구조의 폴리에틸렌이민, 폴리아미도아민(polyamidoamine) (미국특허 제6,020,457호) 등이 유전자의 수송체로 연구되어 왔다. 그러나 이들 양이온성 고분자를 이용한 수송체 경우에는 세포 표면의 수송체를 통하여 효과적으로 수송되는 바이러스성 수송체에 비하여 체내 세포 내로의 수송 효율이 낮다는 문제점이 지적되어 왔다.

지금까지 당 분야에서 사용된 대부분의 양이온성 고분자들은 분자량이 20,000이상의 고분자들이 대부분으로서 양이온성 골드 나노입자를 대상으로 하여 유전자 발현 효율의 증가를 연구한 예는 다양한 세포주들을 대상으로 아직 보고된 바 없었다.

이에 본 발명자들은 양이온성 고분자를 이용한 유전자 수송체들의 문제점들을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 입자경 0.5-10 나노미터 정도의 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체가 분자량 2,000 또는 25,000 이상의 양이온성 고분자들보다 근육세포주에서 유전자 전달 효율 및 유전자 발현량을 현저히 증가시킬 뿐만 아니라 세포 독성도 현저하게 감소시키는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 세포들에서 독성을 감소시키고 세포 내로 목적하는 유전자의 수송 및 발현을 증강시킬 수 있는 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 양이온성 나노 골드입자(Positively charged nanogold)와 유전자의 복합체를 함유하는 동물세포 내 외래 유전자 전달용 조성물을 제공한다.

본 발명의 조성물은 상기 양이온성 나노 골드입자를 유전자의 전달체로 사용하여 다양한 동물 세포내에 목적하는 외래 유전자의 수송 및 발현 효율을 현저히 증강시킬 수 있다. 본 발명의 조성물에서 상기 복합체는 양이온성 나노 골드입자의 양하전과 유전자의 음이온성 하전에 의해 단순한 혼합(mix)에 의해 정전기 결합을 통해 복합체를 형성할 수 있다.

본 발명의 조성물에 있어서, 상기 양이온성 나노 골드입자는 종래 나노 골드입자의 표면을 양이온성 잔기로 처리된 어떤 양이온성 나노 골드입자도 사용될 수 있다. 예컨대, 나노골드 입자는 기본적으로 음전하 상태로 존재하나, 본 발명에 사용된 나노 골드 입자는 입자 표면에 라이신(lysine) 잔기를 부착하여 표면전하를 양이온성으로 변화시킨 형태를 사용하였습니 다. 나노 골드 입자 당 평균 5-7개의 라이신 잔기가 존재합니다.

본 발명의 조성물에 있어서, 상기 양이온성 나노 골드 입자는 유전자의 결합과 동물세포로의 전달을 방해하지 않는 어떤 입자경도 가질 수 있으나, 바람직하게는 0.5-10 나노미터 크기의 입자경을 가지는 것을 특징으로 한다. 본 발명에 사용된 나노 골드 입자와 유전자 결합 조성물이 동물세포의 세포막을 통과할 때 조성물의 체적이 증가하는 경우 세포막을 파괴하여 세포에 영향을 초래할 수 있으므로, 상기 수치범위의 나노 골드 입자를 사용하여 세포막의 파괴에 대한 영향을 최소화 하였다.

본 발명의 조성물에 있어서, 상기 양이온성 나노 골드입자의 몰수와 유전자(DNA) 몰수의 비율은 유전자가 나노골드입자와 충분한 복합체를 형성할 수 있는 어떤 비율로도 혼합될 수 있으나, 바람직하게는 300:1 ~ 5000:1로, 더욱 바람직하게는 1600:1 ~ 3200:1로 혼합되어 있는 것을 특징으로 한다. 상기 수치범위에서 유전자 전달효율을 현저히 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 세포 독성을 최소한으로 할 수 있다.

본 발명의 조성물에 있어서, 상기 유전자는 외래 유전자만으로 될 수도 있으나, 바람직하게는 상기 유전자가 재조합 발현 벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 한다. 이 경우 목적하는 외래 유전자를 동물세포내로 전달할 뿐만 아니라, 이를 발현시킬 수도 있다. 상기 재조합 발현벡터로는 동물세포에서 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 CMV 프로모터와 같은 프로모터를 갖는 어떤 시판중인 발현벡터도 사용할 수 있다.

본 발명의 조성물에 있어서, 상기 동물세포는 외래 유전자의 도입과 발현을 바라는 어떤 동물세포도 가능하나, 바람직하게는 근육세포인 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예에서는 구체적으로 근육세포주인 C2C12 세포주를 사용하였다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명의 조성물을 동물세포에 처리하는 것을 포함하는 동물세포내 외래 유전자의 전달방법을 제공한다.

본 발명의 전달방법은 구체적으로, 양이온성 골드 나노입자와 외래 유전자와 복합체를 제조하는 제 1단계; 상기에서 제조된 복합체를 적당한 세포에 처리하여 세포 내 유전자 발현을 증강시키는 2단계로 구성됨을 특징으로 한다.

상기 제 1단계의 양이온성 입자는 양이온성 골드 나노입자인 것을 특징으로 하며, 복합체 제조 시 양이온성 골드 나노입자의 몰수와 DNA의 몰수의 비율을 2400:1 이상으로 혼합하여 복합체 형성을 위해 실온에서 30분간 방치하는 것을 특징으로 하며, 상기 혼합비로 인해 본 발명의 복합체 조성물을 세포 내로 전달시 유전자 전달 효율을 극대화시킬 수 있는 장점을 가지는 것을 특징으로 하며, 상기 제 2단계의 적절한 세포는 근육 세포인 것을 특징으로 한다. 본 발명에 사용된 조성물은 양전하를 띄고 있으므로 세포막의 음전하와 인력이 작용하여 세포막에 부착되어 엔도사이토시스(endocytosis)에 의해 세포 내부로 유입될 수 있다.

본 발명에서는 세포 내로 전달된 유전자의 양을 구체적으로 정량화하여 측정하기 위하여 외래 유전자를 특이적으로 인식하도록 고안된 프라이머 및 외래 유전자의 내부 표준품 유전자를 사용하여 세포 내로 전달된 유전자를 경쟁적으로 증폭하는 정량성 중합효소 연쇄반응을 사용하였다. 또한 유전자의 발현을 정량적으로 평가하기 위하여 유전자의 단백질로의 발현량을 정량적으로 측정할 수 있는 효소결합면역흡수법(ELISA)을 사용하였다.

본 발명에서 기술된 조성물, 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체는 다양한 세포들에서 유전자 전달 효율 및 유전자 발현량을 분자량 2,000 또는 25,000 (고분자량) 이상의 양이온성 고분자(폴리에틸렌이민)들보다 증가시킬 뿐만 아니라 세포 독성도 현저하게 감소시키는 바, 유전자 치료요법 등에 효과적으로 사용 가능할 것이다.

예를 들어, 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체를 함유하는 조성물을 제조하여 세포 내 발현을 증강시키는 방법은 하기와 같은 공정을 통하여 수행된다.

입자경 0.5-10 nm인 양이온성 골드 나노입자를 외래 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터, 바람직하게는 사이토메갈로바이러스(cytome-galovirus CMV) 프로모터 및 제한 효소 부위를 가지는 플라스미드 벡터와 400:1 이상 3200:1 이하로 혼합하여 실온에서 1 내지 120분, 바람직하게는 20 내지 30분간 방치하여 복합체를 형성시키며 이를 적절한 세포, 바람직하게는 근육 세포에 처리하여 0.5 내지 24시간, 바람직하게는 12내지 24시간 동안 배양한 후 정량성 중합효소 연쇄반응 및 효소결합면역흡수법(ELISA)을 통하여 각 세포에서의 유전자 전달 효율 및 발현량을 비교함으로써 본 발명의 복합체 조성물을 이용한 세포 내 외래 유전자 발현 증강정도를 평가하였다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

실시예 1. 양이온성 골드 나노입자 및 양이온성 고분자와 유전자의 복합체 제조

1-1. 입자경 0.5-10 nm의 양이온성 골드 나노입자 용액 및 양이온성 고분자 용액 제조

입자경 0.5-10 nm인 양이온성 골드 나노입자(Positively charged nanogold, PGN)을 (Nanoprobes, 미국)에서 구입하여 사용하였으며, 분자량 2,000 및 25,000인 양이온성 고분자 폴리에틸렌이민(PEI)을 (Sigma Aldrich, 미국)에서 구입하여 10-100 mM 용액을 제조하여 사용하였다.

1-2. 외래 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터 제조

목적하는 외래 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제조하기 위해 사이토메갈로바이러스(cytome-galovirus CMV) 프로모터 및 제한 효소를 사용하여 제조하였다. 목적하는 외래 유전자의 예로서 쥐(Mus Musculus)의 인터류킨-2 유전자(mouse 유래, NCBI accession number NM_008366)의 단편을 중합효소 연쇄반응으로 긴 단편 말단에 제한 효소 작용 부위가 있도록 증폭하거나 클로닝 벡터에서 직접 제한효소를 처리하여 1차적으로 수득하였다. 상기 유전자 단편을 CMV 프로모터가 존재하는 발현용 벡터 pVAX-1 (Invitrogen사, USA)의 멀티클로닝 사이트(multicloning site) 중의 동일한 제한 효소 부위(NheI 과 BamHI) 내로 삽입하여 재조합 발현 벡터의 제작을 완성하였다. 본 벡터의 제작 확인은 중합효소 연쇄반응시의 증합반응 산물의 크기 또는 제한 효소 처리시의 단편의 숫자 및 단편의 크기를 아가로스 젤에 전기영동 하여 평가하였다.

1-3. 외래 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터와 양이온성 고분자의 복합체 조성물 제조

외래 유전자를 함유하는 재조합 발현 벡터와 양이온성 골드 나노입자의 복합체 및 양이온성 고분자 폴리에틸렌이민의 복합체 조성물을 제조하기 위해 양이온성 골드 나노입자 용액 및 폴리에틸렌이민 용액에 외래 유전자, 즉 상기 실시예 1-1에

서 제조된 양이온성 골드 나노입자, 분자량 2,000 폴리에틸렌이민, 또는 분자량 25,000의 폴리에틸렌이민 용액에 각각 외래 유전자, 즉 상기 실시예 1-2에서 제조된 인터류킨-2 유전자를 일정 비율(2:1~80:1)로 가하고 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치시켰다.

1-4. 외래 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터와 양이온성 골드 나노입자의 복합체 조성물 측정

외래 유전자를 함유하는 재조합 발현 벡터와 양이온성 골드 나노입자의 복합체 조성물을 제조하기 위해 실시예 1-3에서 제조된 양이온성 골드 나노입자와 인터류킨-2 유전자를 일정 비율(양이온성 골드 나노입자 몰수 대 인터류킨-2 유전자 몰수, 100 - 3200:1)로 가하고 혼합한 다음 37℃에서 30분간 방치시킨 후 아가로즈 젤에 전기영동하여 확인하였다.

본 실험 수행결과, 도 1에서 보는 바와 같이 양이온성 골드 나노입자의 양이 증가할수록 양이온성 골드 나노입자와 인터류킨-2 유전자 플라스미드의 복합체의 양이 증가하여 결합체를 형성하지 않은 인터류킨-2 유전자 플라스미드의 양이 감소하는 결과를 확인할 수 있었다. 도 1에서, lane 1부터 9까지의 골드 나노입자 대 유전자의 몰 비율은 각각 100:1, 200:1, 400:1, 800:1, 1200:1, 1600:1, 2000:1, 2400:1, 3200:1이다.

1-5. 외래 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터와 양이온성 골드 나노입자의 복합체 조성물 크기 측정

외래 유전자를 함유하는 재조합 발현 벡터와 양이온성 골드 나노입자의 복합체 조성물을 제조하기 위해 실시예 1-3에서 제조된 양이온성 골드 나노입자와 인터류킨-2 유전자를 일정 비율(양이온성 골드 나노입자 몰수 대 인터류킨-2 유전자 몰수, 400 - 3200:1)로 가하고 혼합한 다음 37℃에서 30분간 방치시킨 후 ELS-8000 제타 포텐시오미터를 사용하여 입자의 직경을 측정하였다.

본 실험 수행결과, 도 2에서 보는 바와 같이 양이온성 골드 나노입자의 양이 증가할수록 양이온성 골드 나노입자와 인터류킨-2 유전자 플라스미드의 복합체의 크기가 증가하는 것으로 확인되었으며, 양이온성 골드 나노입자와 외래 유전자의 결합 비율이 2400:1인 경우에는 평균 직경이 350 나노미터에 해당되었다.

실시예 2. 외래 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터와 양이온성 골드 나노입자 복합체 및 양이온성 고분자 복합체의 세포 내 유전자 전달 및 발현

외래 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터와 양이온성 골드 나노입자 복합체 및 양이온성 고분자 복합체의 세포 내 유전자 발현 및 전달 효율성을 보기 위하여 근육 세포주인 C2C12 세포를 사용하였다.

2-1. 근육세포주에서의 유전자 전달 효율

외래 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터와 양이온성 골드 나노입자 및 양이온성 고분자로 이루어진 복합체를 사용하여 세포 내로 전달된 외래 유전자의 세포 내 전달 효율성을 평가하기 위하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다.

근육 세포주인 C2C12 세포는 DMEM (Dulbecco's modified eagles medium)에 우혈청이 10 % 첨가된 배지를 제조하여 배양하였다.

C2C12 세포주에 입자경 0.5-10 nm인 양이온성 골드 나노입자와 인터류킨-2 유전자의 복합체 조성, 분자량 2,000인 폴리에틸렌이민과 인터류킨-2 유전자의 복합체 조성, 분자량 25,000인 폴리에틸렌이민과 인터류킨-2 유전자의 복합체 조성, 그리고 유전자 자체를 각각 1 μ g의 농도로 각각 가하고 4시간동안 배양한 다음 세포를 수세하고 DNA 졸 (DNAzol (인비트로젠 (Invitrogen), 미국))과 DNA 클린 업 키트 (DNA clean up kit (프로메가 (Promega), 미국))를 사용하여 세포에서 유전자를 분리 정제한 다음 세포내로 전달된 유전자의 양을 인터류킨-2 유전자의 내부 표준품을 첨가한 후 중합효소 연쇄반응으로 정량적으로 측정하였다.

중합효소 연쇄반응은 먼저 10 pmol의 센스 (sense) 및 안티센스 프라이머 (antisense primer)를 각각 0.48 μ l씩, 탭 폴리머라아제 (Taq polymerase) (5 U/ μ l, 바이오니아 (Bioneer)) 0.072 μ l, dNTP (각 dNTP 2.5 mM, 바이오니아 (Bioneer)), 10 $\times$ 반응 완충액 (reaction buffer)로 전체 반응 용량 약 6.24 μ l로 한 혼합액과 유전자가 일부 소실된 인터류킨 유사체 표준품 플라스미드 (mIL-2 mimic), 목적 (target)이 되는 DNA를 넣어서 수행하였다. 센스 프라이머 (5'→3')는 ACG-ACT-CAC-TAT-AGG-GAG-ACC-C, 안티센스 프라이머 (3'→5')는 CAA-CTA-GAA-GGC-ACA-GTC-GAG-G이며, 중합효소 연쇄반응 조건은 95 °C에서 40초, 56 °C에서 30초, 72 °C에서 30초의 반응을 33 회 (cycle) 반복 시행함으로써

증폭을 수행하였다. 중합효소 연쇄반응 생성물은 1.5 %의 아가로스 겔 (agarose gel)에서 전기영동 하였으며 겔 분석 기기 (Gel Doc Video Gel Documentation System)를 사용하여 이미지를 저장하고 바이오 아이디 소프트웨어 (Bio ID software)로 겔 밀도의 측정 및 정량화 분석을 수행하였다.

본 실험 수행 결과, 도 3에서 보는 바와 같이, 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체는 복합체의 조성 비율 (양이온성 골드 나노입자 몰수 대 인터류킨-2 유전자 몰수)이 2400:1 인 경우에 가장 증가된 양의 유전자를 C2C12 세포로 수송하는 것을 확인할 수 있었으며, 복합체 조성 비율이 3200:1 인 경우에는 2400:1에 비해 유전자 수송 능력이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

또한, 도 4에서 보는 바와 같이, 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체는 복합체의 조성 비율이 2400:1인 경우에 분자량 25,000의 양이온성 고분자 (폴리에틸렌이민)와 유전자의 복합체의 조성에 비해 10배 정도 증가된 유전자 전달 효율을 보여주었다.

2-2. 근육세포주에서의 유전자 발현 효율

외래 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터와 양이온성 골드 나노입자 및 양이온성 고분자로 이루어진 복합체를 사용하여 세포 내로 전달된 외래 유전자의 세포 내 전달 효율성을 평가하기 위하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다.

실시에 2-1에서 기재된 바와 같이, C2C12 세포를 배양하였으며, C2C12 세포주에 입자경 0.5-10 nm인 양이온성 골드 나노입자와 인터류킨-2 유전자의 복합체 조성, 분자량 2,000인 폴리에틸렌이민과 인터류킨-2 유전자의 복합체 조성, 분자량 25,000인 폴리에틸렌이민과 인터류킨-2 유전자의 복합체 조성, 그리고 유전자 자체를 각각 1 μ g의 농도로 각각 가하고 4시간동안 배양한 다음 세포를 수세하고 새로운 우혈청 첨가 DMEM 배지에서 20시간 동안 추가로 배양한 후 각각의 복합체 조성이 도입된 세포주의 배양 상등액을 회수하여 효소결합면역흡수법(ELISA) 쥐 인터류킨-2 키트 (mIL-2 ELISA kit, Pierce Endigen, 미국)를 이용해 C2C12 세포주에 삽입된 인터류킨-2 유전자의 단백질 발현량을 확인하였다.

도 6에서 보는 바와 같이, 양이온성 골드 나노입자와 유전자 복합체 조성물을 사용한 세포주에서의 인터류킨-2의 발현량이 유전자 자체 조성 및 분자량 2,000인 폴리에틸렌이민과 유전자의 복합체 조성, 분자량 25,000인 폴리에틸렌이민과 유전자의 복합체 조성에 비해 각각 40배 이상, 3배 이상, 2배 이상 높은 인터류킨-2의 발현량을 보여주었다.

실시에 3. 근육세포주에서의 세포 독성 평가

외래 유전자의 세포 내 발현 및 전달 효율성을 향상시키기 위하여 사용된 외래 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 양이온성 골드 나노입자로 이루어진 복합체의 세포 독성에 관한 평가를 하기 위하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다.

C2C12 근육세포주에 입자경 0.5-10 nm인 양이온성 골드 나노입자와 인터류킨-2 유전자의 복합체 조성, 분자량 2,000인 폴리에틸렌이민과 인터류킨-2 유전자의 복합체 조성, 분자량 25,000인 폴리에틸렌이민과 인터류킨-2 유전자의 복합체 조성, 그리고 유전자 자체 조성을 제조하고 세포 독성을 평가하였다.

독성 평가 방법으로는 MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-di -phenyl tetrazolium bromide) 방법을 사용하였다. 세포를 1×10^4 cells/well이 되도록 분주 (seeding)하고 12시간 배양한 후 양이온성 골드 나노입자와 인터류킨-2 유전자의 복합체 조성, 분자량 2,000인 폴리에틸렌이민과 인터류킨-2 유전자의 복합체 조성, 분자량 25,000인 폴리에틸렌이민과 인터류킨-2 유전자의 복합체 조성, 그리고 유전자 자체 조성을 제조하고 첨가하였다. 복합체를 처리하고 24시간 경과 후 각각 MTT 용액을 배지의 10 %가 되도록 가하고, 4시간 더 배양 한 다음 상층액을 제거하고 0.04 N 염산 이소프로판올 용액을 첨가한 후에 엘라이저 리더 (ELISA reader)를 이용하여 590 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 양이온성 고분자와 유전자의 복합체를 처리하지 않은 세포가 사용되었으며 세포의 생존률 (Cell viability)은 하기와 같은 식으로 계산되었다.

[수학적식]

세포의 생존률 (%) = (실험군의 OD / 대조군의 OD) $\times$ 100

본 실험 수행 결과, 도 7에서 보는 바와 같이, 양이온성 나노 골드입자와 유전자 복합체 조성물은 분자량 2,000 및 25,000인 폴리에틸렌이민을 사용한 복합체 조성물에 비해 세포 독성이 상당히 감소하는 것으로 나타남을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

상술한 바와 같이, 본 발명의 양이온성 나노 골드입자(입자경 0.5-10 nm)와 유전자 복합체 조성물은 근육세포주에서 유전자 전달 효율 및 유전자 발현량을 분자량 2,000 및 25,000이상의 양이온성 고분자(폴리에틸렌이민)들 보다 탁월하게 증가시킬 뿐만 아니라 세포 독성도 현저히 감소시킴으로써 다양한 세포들을 대상으로 목적하는 유전자를 효과적으로 세포 내로 수송하고 발현시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체 조성물을 조성물 형성 시 복합체의 유전자가 양이온성 골드 나노입자와 결합하여 전기영동이 지연된 결과를 나타낸 결과이고,

도 2는 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체 조성물의 결합 비율을 달리한 경우 형성된 복합체의 크기를 측정한 결과로 복합체 형성 시 양이온성 골드 나노입자의 양이 증가할수록 형성된 복합체의 크기가 증가한다는 것을 나타내는 결과이고,

도 3은 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체 조성물의 결합 비율을 달리한 경우 형성된 복합체가 근육세포주인 C2C12 세포내 유전자 전달 효율이 변화하는 것을 정량적으로 나타내는 결과이고,

도 4는 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체 조성물이 근육세포주인 C2C12 세포에서 분자량 25,000 이상의 양이온성 고분자(폴리에틸렌이민)와 유전자의 복합체 조성물에 비하여 세포 내 유전자 전달 효율이 높다는 것을 정량적으로 나타내는 결과이고,

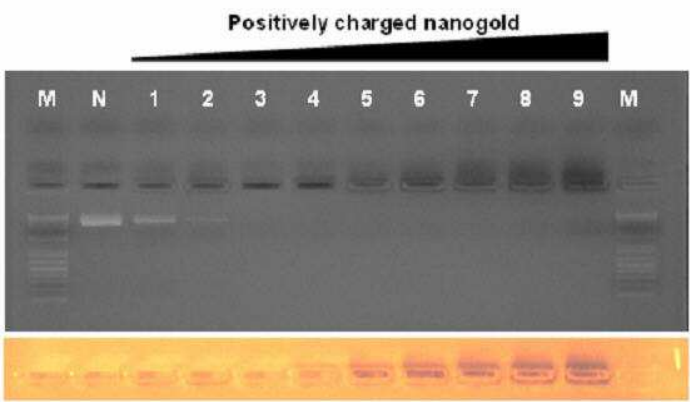
도 5는 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체 조성물을 전자현미경(TEM)을 이용하여 관찰한 결과로서 A는 양이온성 골드 나노입자 (입자경 0.5 - 10 nm, 검은색 입자)를 나타내며, B는 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체 조성물 (붉은색은 유전자의 탄소를 나타내며, 검은색 입자들은 양이온성 골드 나노입자를 나타냄)을 촬영한 결과이고,

도 6은 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체 조성물이 분자량 2,000 이상의 양이온성 고분자(폴리에틸렌이민) 또는 분자량 25,000 이상의 양이온성 고분자(폴리에틸렌이민)와 유전자 복합체에 비하여 유전자의 발현을 증가시킨다는 것을 근육세포주인 C2C12 세포에서 유전자가 암호하고 있는 단백질의 발현량을 정량적으로 나타내는 결과이고,

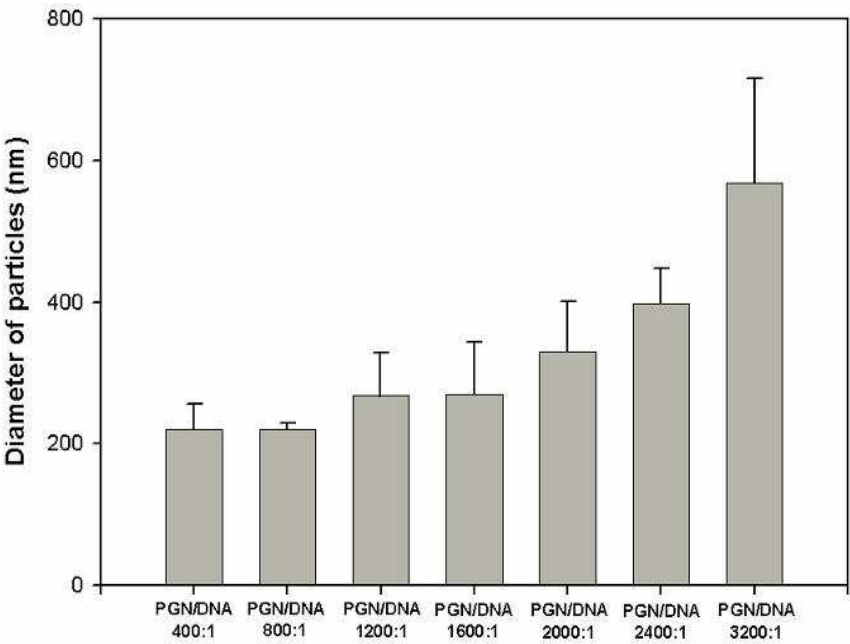
도 7은 양이온성 골드 나노입자와 유전자의 복합체 조성물이 분자량 2000 이상의 양이온성 고분자(폴리에틸렌이민) 또는 분자량 25000 이상의 양이온성 고분자(폴리에틸렌이민)와의 유전자 복합체에 비하여 세포 독성이 작다는 것을 C2C12 세포에서 세포독성 실험을 수행한 결과이다.

도면

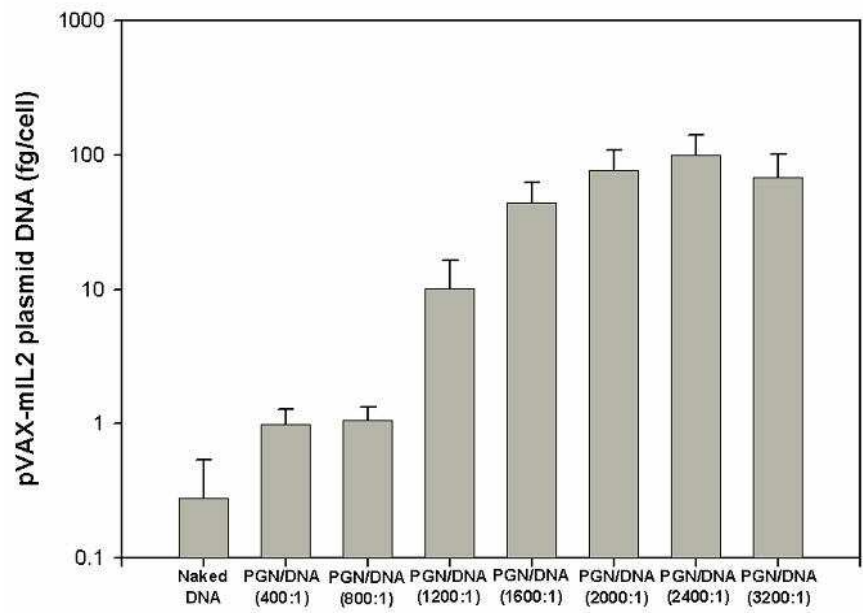
도면1



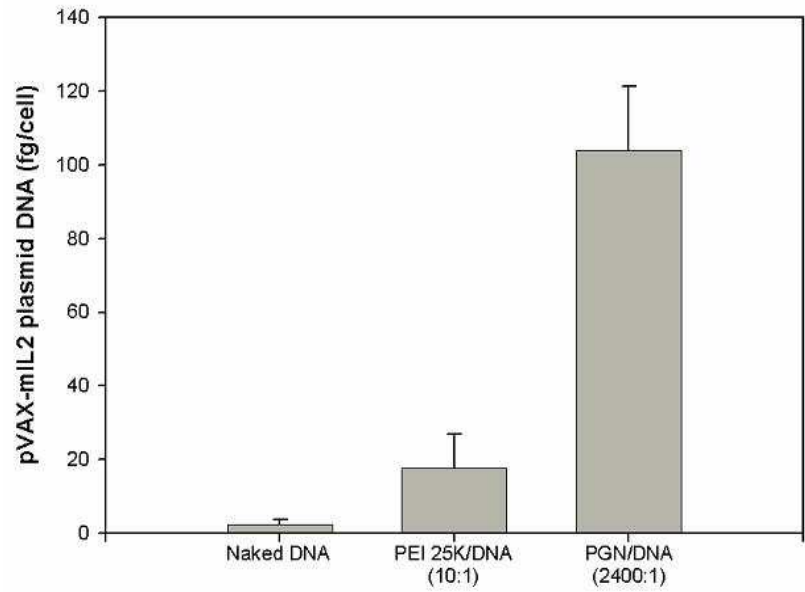
도면2



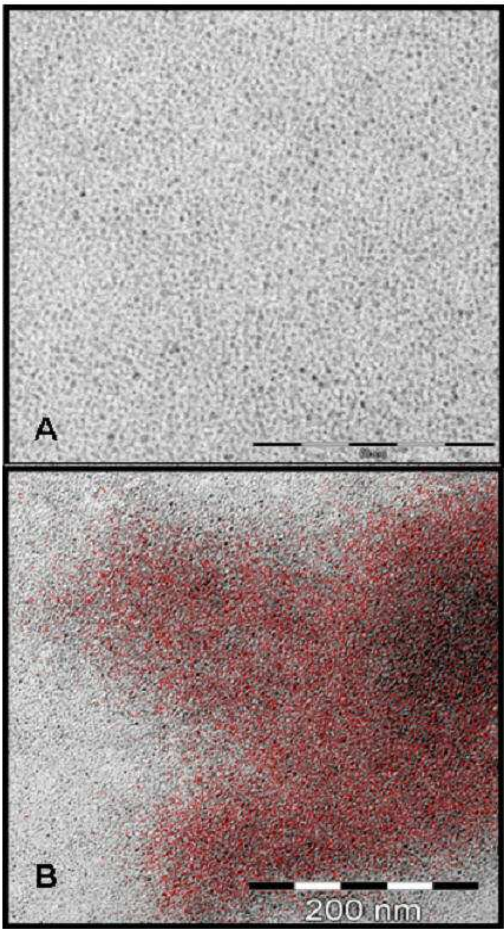
도면3



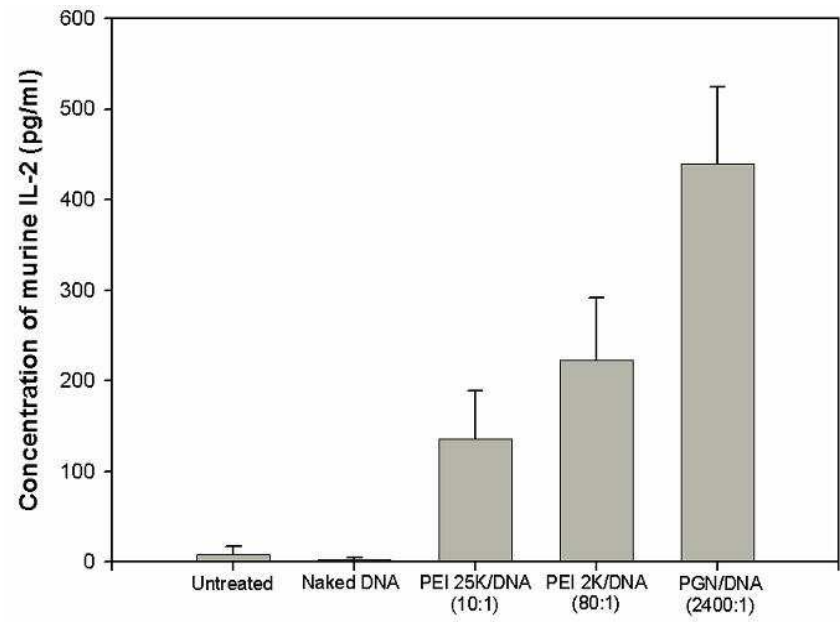
도면4



도면5



도면6



도면7

Complexes	Cell viability, % of control
None (Untreated) DNA	100 ± 3
Naked DNA	92 ± 2
PEI25K/DNA(10:1)	77 ± 4
PEI2K/DNA(80:1)	76 ± 2
PGN/DNA(2400:1)	88 ± 3