	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0094166 (43) 공개일자 2012년08월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01) A61K 48/00 (2006.01)		(71) 출원인 베일러 칼리지 오브 메디신 미국 텍사스주 77030 휴스턴 스위트 186 에이, 원 베일러 플라자
(21) 출원번호 10-2012-7012633 (22) 출원일자(국제) 2010년10월15일 심사청구일자 없음		(72) 발명자 제키드리치 이. 린 미국 텍사스주 77035 휴스턴 브리아르벤드 드라이브 4321
(85) 번역문제출일자 2012년05월16일 (86) 국제출원번호 PCT/US2010/052920 (87) 국제공개번호 WO 2011/047318 국제공개일자 2011년04월21일		포그 조나단 미국 텍사스주 77054 휴스턴 홀리 홀 스트리트 2111 아파트먼트 2808 (뒷면에 계속)
(30) 우선권주장 61/252,455 2009년10월16일 미국(US)		(74) 대리인 김진희, 김성기
전체 청구항 수 : 총 44 항		
(54) 발명의 명칭 유전자 치료 적용을 위한 초나선회된 미니서클 DNA		

(57) 요약

본 발명은 핵산 서열을 코딩하는 미니벡터를 포함하는 핵산 분자 조성물 및 핵산 서열을 코딩하는 미니벡터를 이용하는 유전자 치료 방법에 관한 것이다.

(72) 발명자

카타니즈 주니어 다니엘 제임스

미국 텍사스주 77082 휴스턴 마크스콧 드라이브
3107

바칼마시 에롤

미국 텍사스주 77025 휴스턴 브롬프톤 로드 7510
아파트먼트 #611

길버트 브라이언 이.

미국 텍사스주 77096 휴스턴 제이슨 스트리트 5171

특허청구의 범위

청구항 1

미니백터를 포함하는 핵산 분자 조성물로서, 상기 미니백터는 핵산 서열을 코딩하는 것인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 핵산 서열은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 마이크로 RNA (miRNA)를 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 핵산 서열은 단백질; 상이한 DNA 서열; RNA 서열; 및 세포막으로 이루어진 군으로부터 선택된 성분이 결합할 수 있는 DNA를 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 핵산 서열은 유전자를 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 미니백터는 화학 부분(chemical moiety), 개질된 올리고뉴클레오타이드, 및/또는 개질된 주쇄를 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 화학 부분은 플루오레세인, 바이오틴, 염료, 및 콜레스테롤로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 7

세포를 미니백터와 접촉시키는 단계를 포함하는 세포에서 유전자의 발현을 침묵시키는 방법으로서, 상기 미니백터는 핵산 서열을 코딩하고, 상기 핵산 서열은 유전자의 발현을 침묵시키는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 핵산 서열은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 마이크로 RNA (miRNA)를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 핵산 서열은 단백질; 상이한 DNA 서열; RNA 서열; 및 세포막으로 이루어진 군으로부터 선택된 성분이 결합할 수 있는 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 핵산 서열은 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

치료적 유효량의 미니백터를 유전자 치료가 필요한 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 유전자 치료 방법으로서, 상기 미니백터는 핵산 서열을 코딩하는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 핵산 서열은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 마이크로 RNA (miRNA)를 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 핵산 서열은 단백질; 상이한 DNA 서열; RNA 서열; 및 세포막으로 이루어진 군으로부터

선택된 성분이 결합할 수 있는 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 핵산 서열은 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 포유동물은 인간인 것인 방법.

청구항 16

치료적 유효량의 미니백터를 세포에 투여하는 단계를 포함하는 유전자 치료 방법으로서, 상기 미니백터는 핵산 서열을 코딩하는 것인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 핵산 서열은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 마이크로 RNA (miRNA)를 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 핵산 서열은 단백질; 상이한 DNA 서열; RNA 서열; 및 세포막으로 이루어진 군으로부터 선택된 성분이 결합할 수 있는 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 핵산 서열은 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 상기 세포는 포유동물 세포인 것인 방법.

청구항 21

유효량의 미니백터를 포유동물 세포에 투여하는 단계를 포함하는 포유동물 세포에서 역형성 림프종 키나아제 (anaplastic lymphoma kinase) 유전자 발현을 침묵시키는 방법으로서, 상기 미니백터는 핵산 서열을 코딩하고, 상기 미니백터는 역형성 림프종 키나아제 유전자 발현을 침묵시키는 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 핵산 서열은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 마이크로 RNA (miRNA)를 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 핵산 서열은 단백질; 상이한 DNA 서열; RNA 서열; 및 세포막으로 이루어진 군으로부터 선택된 성분이 결합할 수 있는 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 핵산 서열은 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제21항에 있어서, 상기 포유동물 세포는 인간 세포인 것인 방법.

청구항 26

암 치료가 필요한 포유동물에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 포유동물에 치료적 유효량의 미니백터 또는 미니백터를 포함하는 포유동물 세포를 투여하는 단계를 포함하고, 상기 미니백터는 핵산 서열을 코딩하는 것인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 핵산 서열은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 마이크로 RNA (miRNA)를 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 핵산 서열은 단백질; 상이한 DNA 서열; RNA 서열; 및 세포막으로 이루어진 군으로부터 선택된 성분이 결합할 수 있는 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기 핵산 서열은 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 30

제26항에 있어서, 상기 포유동물은 인간인 것인 방법.

청구항 31

제26항에 있어서, 암은 비호지킨 림프종인 것인 방법.

청구항 32

제26항에 있어서, 비호지킨 림프종은 역형성 대세포 림프종인 것인 방법.

청구항 33

세포를 미니백터와 접촉시키는 단계를 포함하는 세포에서 유전자를 발현시키는 방법으로서, 상기 미니백터는 핵산 서열을 코딩하고, 상기 핵산 서열은 유전자를 발현시키는 것인 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 핵산 서열은 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 상기 세포는 포유동물 세포인 것인 방법.

청구항 36

포유동물의 호흡기의 세포에 치료적 유효량의 미니백터를 전달하는 단계를 포함하는 유전자 치료 방법으로서, 상기 미니백터는 핵산 서열을 코딩하는 것인 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 핵산 서열은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 마이크로 RNA (miRNA)를 포함하는 것인 방법.

청구항 38

제36항에 있어서, 상기 핵산 서열은 단백질; 상이한 DNA 서열; RNA 서열; 및 세포막으로 이루어진 군으로부터 선택된 성분이 결합할 수 있는 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제36항에 있어서, 상기 핵산 서열은 유전자를 포함하는 것인 방법.

청구항 40

제36항에 있어서, 상기 포유동물은 인간인 것인 방법.

청구항 41

제36항에 있어서, 상기 미니백터는 분무(nebulization) 장치의 사용에 의해 전달되는 것인 방법.

청구항 42

제36항에 있어서, 상기 미니백터는 담체 분자의 부재하에 전달되는 것인 방법.

청구항 43

제36항에 있어서, 상기 미니백터는 포유동물의 호흡기의 코 점막에 전달되는 것인 방법.

청구항 44

제1항의 조성물을 포함하는 포유동물 세포.

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2009년 10월 16일자에 출원된 미국 가출원 제61/252,455호의 이익을 청구한다. 상기 출원의 전체 교시는 본원에서 전적으로 인용된다.

[0003] 정부 지원

[0004] 본 발명은 승인 번호 R01-AI054830 하에 미국립보건원에 의해 전적으로 또는 부분적으로 후원되었다. 미정부는 본 발명에 대해 특정의 권리를 가진다.

배경기술

[0005] 유전자 치료(Gene therapy)는 질환과 결부된 결함 유전자를 고치기 위해 병든 기관 또는 세포로 DNA 또는 RNA의 전달을 수반한다. 이는 다수의 다양한 접근법을 통해 달성될 수 있다. 증상이 결여되거나 비기능적인 유전자 생성물에 기인한 것이라면, 해당 유전자의 기능적인 카피(copy)를 질환 위치로 전달할 수 있다. 대안으로는, 유전자 발현이 RNA 간섭 기술, 예컨대 짧은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 및 마이크로 RNA (miRNA)를 이용하여 제어될 수 있다. 상보적인 짧은 간섭 RNA (siRNA)에 의해 특정 mRNA를 표적화하여 분해하는 천연 세포 프로세스인 RNA 간섭 (RNAi)은 세포 수준에서 단일 유전자의 특이적인 침묵(silencing)을 가능하게 한다. 다양한 생물학¹ 및 임상 연구²⁻⁴는 RNAi가 효과적인 치료 접근법으로서 엄청난 잠재가능성을 가지고 있음을 보여주고 있다. 전형적으로 RNA 간섭은 병인성 유전자의 발현을 하향 조절하는 데 사용되지만, 유전자 프로모터에서 조절 영역을 표적화함으로써 유전자의 상향 조절이 가능하다¹⁵.

[0006] 유전자 치료의 엄청난 치료 잠재성 및 우수한 후보자로서 확인된 다수의 질환에도 불구하고, 이 분야는 지금까지 성공에 이르지 못하고 있다. 이러한 실패는 대개는 유전자 전달과 관련된 합병증에 기인한다. 전달 효율은 가장 일반적인 전달 방법인 바이러스 벡터의 경우에 높지만, 임상적인 시도에서 관찰된 문제점(독성, 면역 및 염증 반응, 표적화 및 투약량 조절의 어려움 포함)으로 인해 제한된 치료 능력을 가진다. 이외에도 벡터가 게놈안으로 통합되어 장기간에 걸친 미지의 영향을 미칠 수 있다는 우려, 그리고 바이러스가 질환을 야기하는 능력을 회복시킬 가능성이 있다는 점이다.

[0007] 따라서 비바이러스 벡터 시스템, 예컨대 플라스미드 DNA를 대상으로 많은 노력이 행해지고 있다. 이러한 벡터는 제조 및 보관이 간단하고 세포에서 안정적으로 존속할 수 있기 때문에 매력적이지만, 면역독성 반응을 유발할 수 있는 박테리아 DNA 서열을 함유한다. 수지상 세포 및 T-세포를 포함한 몇몇 인간 세포는 기존의 플라스미드 벡터로 효율적으로 형질감염될 수 없다. 짧은 선형 DNA 벡터 및 작은 RNA, 예컨대 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 및 마이크로-RNA (miRNA)는 플라스미드보다 좀더 쉽게 세포에 도입되어진다. 그러나 선형 DNA 및 RNA 말단은 세포에 의한 빠른 분해를 유발하며, 이는 연속적인 보충을 필요로 한다. 또한, 이러한 DNA 말단은 수선 및 재조합 경로에 신호를 보내어 세포사멸(apoptosis)을 야기할 수 있다. 이러한 이유로 인해, RNAi- 및 miRNA-계 기술은 임상적으로 크게 성공하지 못하고 있다. 유전자 치료 벡터를 세포에 치료적으로 전달하는 새

롭고 효율적인 방법에 대한 필요성이 절실하다.

[0008] 플라스미드 DNA 벡터는 제조 및 단리가 간단하기 때문에 기본적인 연구에서 약간의 효용을 가진다. 이러한 벡터는 박테리아 균주에서 증식하고 박테리아 세포로부터 회수된다. 그러나, 앞서 언급한 바와 같이, 이는 박테리아 DNA 서열, 특히 원핵생물 유래 복제 기원 및 플라스미드의 생존을 위한 항생제 저항 마커를 함유할 것을 요구한다. 이러한 박테리아 서열의 존재는 다수의 매우 심각한 그리고 유해한 결과가 초래된다. 가장 눈에 띄게는, 플라스미드를 작게 제작할 수 있는 방법을 제약한다. 수 kbp의 큰 플라스미드는 매우 낮은 효율로 형질감염된다. 이러한 큰 사이즈는 또한 전달 (예, 에어로졸화(aerosolisation)를 통해)과 관련된 수력학적(hydrodynamic) 전달력에 대해 또는 혈액에서 민감하도록 만든다. 전달-유도된 분해는 유전자 치료용 비바이러스 벡터를 사용하는 데 있어 실패에 대한 적어도 부분적으로 원인이 되는 생물학적 활성의 상실을 야기한다. 형질감염이 가진 이러한 문제점을 완화시키기 위해 다양한 양이온 및 리포솜 형질감염제가 시험적으로 디자인되고 있지만 이들은 세포독성 문제를 동반한다. 이외에도, 플라스미드상의 박테리아 서열은 플라스미드¹⁴상에서 운반되는 유전자의 침묵을 유도할 수 있는데, 이는 비록 플라스미드가 성공적으로 형질감염되더라도 효능 상실을 야기한다. 진핵생물 DNA 서열 보다 박테리아 서열에서 보다 일반적인 CpG 모티프가 또한 포유동물 세포에서 면역 반응을 유도한다. DNA 벡터의 크기 감소는 세포 형질감염 효율을 증가시키기 위한 적절한 방법인 것으로 여겨진다. 플라스미드상의 박테리아 서열을 물리적으로 제거할 수 있고 오직 치료 서열만을 함유하는 결과적인 짧은 선형 DNA 분해를 통상적인 플라스미드 벡터 보다 좀더 쉽게 세포에 도입할 수 있다고 생각되어질 수 있다. 불행히도, 선형 DNA의 말단은 생체내에서 생물반응성이 매우 높아 세포사멸뿐만 아니라 세포 DNA 수선 및 재조합 프로세스를 유도한다. 이에, 생물학적 환경에서 안정하고 세포 형질감염 및 트랜스젠(transgene) 발현을 보다 잘 허용하는 유전자 표적 요법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 미니벡터(minivector)를 포함하는 핵산 분자 조성물로서, 상기 미니벡터는 핵산 서열을 코딩하는 조성물을 제공한다. 일 실시양태에서, 미니벡터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 미니벡터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 마이크로 RNA (miRNA)를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 미니벡터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 유전자를 포함한다. 부가적인 실시양태에서, 미니벡터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 또다른 세포 성분 예컨대 단백질, 상이한 DNA 서열, RNA 서열, 또는 세포막이 결합할 수 있는 DNA를 포함한다.

[0010] 임의의 실시양태에서, 미니벡터는 원한다면 화학 부분(chemical moiety) (예, 콜레스테롤, 플루오레세인, 바이오틴, 염료 또는 다른 부분)으로 표지될 수 있거나; 대안으로 또는 부가적으로, 부가적인 변형체 예컨대 개질된(modified) 염기 또는 개질된 주쇄(backbones)가 또한 포함될 수 있다.

[0011] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 세포를 미니벡터와 접촉시키는 단계를 포함하는 세포에서 유전자의 발현을 침묵시키는 방법으로서, 상기 미니벡터는 핵산 서열을 코딩하고, 상기 핵산 서열은 유전자의 발현을 침묵시키는 것인 방법을 제공한다. 일 실시양태에서, 미니벡터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 미니벡터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 마이크로 RNA (miRNA)를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 미니벡터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 유전자를 포함한다. 부가적인 실시양태에서, 미니벡터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 또다른 세포 성분 예컨대 단백질, 상이한 DNA 서열, RNA 서열, 또는 세포막이 결합할 수 있는 DNA를 포함한다. 임의의 실시양태에서, 미니벡터는 원한다면 상술한 바와 같이 (예, 화학 부분, 및 대안으로 또는 부가적으로, 개질된 염기 및/또는 개질된 주쇄) 표지될 수 있다. 추가의 실시양태에서, 세포는 포유동물 (예, 인간) 세포이다.

[0012] 일 실시양태에서 본 발명은 치료적 유효량의 미니벡터를 유전자 치료를 필요로 하는 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 유전자 치료 방법으로서, 상기 미니벡터는 핵산 서열을 코딩하는 것인 방법에 관한 것이다. 일 실시양태에서, 미니벡터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 미니벡터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 마이크로 RNA (miRNA)를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 미니벡터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 유전자를 포함한다. 부가적인 실시양태에서, 미니벡터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 또다른 세포 성분 예컨대 단백질, 상이한 DNA 서열, RNA 서열, 또는 세포막이 결합할 수 있는 DNA를 포함한다. 임의의 실시양태에서, 미니벡터는 원한다면 상술한 바와 같이 (예, 화학 부분, 및 대안으로 또는 부가적

으로, 개질된 염기 및/또는 개질된 주쇄) 표지될 수 있다. 추가의 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.

[0013] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 치료적 유효량의 미니백터를 세포에 투여하는 단계를 포함하는 유전자 치료 방법으로서, 미니백터는 핵산 서열을 코딩하는 것인 방법에 관한 것이다. 일 실시양태에서, 미니백터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 미니백터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 마이크로 RNA (miRNA)를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 미니백터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 유전자를 포함한다. 부가적인 실시양태에서, 미니백터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 또다른 세포 성분 예컨대 단백질, 상이한 DNA 서열, RNA 서열, 또는 세포막이 결합할 수 있는 DNA를 포함한다. 임의의 실시양태에서, 미니백터는 원한다면 상술한 바와 같이 (예, 화학 부분, 및 대안으로 또는 부가적으로, 개질된 염기 및/또는 개질된 주쇄) 표지될 수 있다. 또다른 실시양태에서, 세포는 포유동물 (예, 인간) 세포이다.

[0014] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 포유동물의 호흡기의 세포에 치료적 유효량의 미니백터를 전달하는 단계를 포함하는 유전자 치료 방법으로서, 상기 미니백터는 핵산 서열을 코딩하는 것인 방법에 관한 것이다. 미니백터는 분무(nebulization) 장치의 사용에 의해 호흡기에 투여될 수 있고, 담체 분자의 부재하에 투여될 수 있다. 일 실시양태에서, 미니백터는 포유동물의 호흡기의 코 점막에 투여될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 미니백터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 마이크로 RNA (miRNA)를 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 미니백터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 유전자를 포함한다. 부가적인 실시양태에서, 미니백터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 또다른 세포 성분 예컨대 단백질, 상이한 DNA 서열, RNA 서열, 또는 세포막이 결합할 수 있는 DNA를 포함한다. 임의의 실시양태에서, 미니백터는 원한다면 상술한 바와 같이 (예, 화학 부분, 및 대안으로 또는 부가적으로, 개질된 염기 및/또는 개질된 주쇄) 표지될 수 있다.

[0015] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 유효량의 미니백터를 포유동물 세포에 투여하는 단계를 포함하는 포유동물 세포에서 역형성 림프종 키나아제(anaplastic lymphoma kinase) 유전자 발현을 침묵시키는 방법으로서, 상기 미니백터는 핵산 서열을 코딩하고, 상기 미니백터는 역형성 림프종 키나아제 유전자 발현을 침묵시키는 것인 방법에 관한 것이다. 일 실시양태에서, 미니백터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 미니백터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 마이크로 RNA (miRNA)를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 미니백터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 유전자를 포함한다. 부가적인 실시양태에서, 미니백터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 또다른 세포 성분 예컨대 단백질, 상이한 DNA 서열, RNA 서열, 또는 세포막이 결합할 수 있는 DNA를 포함한다. 임의의 실시양태에서, 미니백터는 원한다면 상술한 바와 같이 (예, 화학 부분, 및 대안으로 또는 부가적으로, 개질된 염기 및/또는 개질된 주쇄) 표지될 수 있다. 또다른 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다.

[0016] 일 실시양태에서, 본 발명은 암 치료가 필요한 포유동물에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 포유동물에 치료적 유효량의 미니백터 또는 미니백터를 포함하는 포유동물 세포를 투여하는 단계를 포함하고, 상기 미니백터는 핵산 서열을 코딩하는 것인 방법에 관한 것이다. 일 실시양태에서, 미니백터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 짧은 헤어핀 RNA (shRNA)를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 미니백터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 마이크로 RNA (miRNA)를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 미니백터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 유전자를 포함한다. 부가적인 실시양태에서, 미니백터에 의해 코딩되는 핵산 서열은 또다른 세포 성분 예컨대 단백질, 상이한 DNA 서열, RNA 서열, 또는 세포막이 결합할 수 있는 DNA를 포함한다. 임의의 실시양태에서, 미니백터는 원한다면 상술한 바와 같이 (예, 화학 부분, 및 대안으로 또는 부가적으로, 개질된 염기 및/또는 개질된 주쇄) 표지될 수 있다. 추가의 실시양태에서, 포유동물은 인간이다. 일 실시양태에서, 암은 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma)이다. 또다른 실시양태에서, 비호지킨 림프종은 역형성 대세포 림프종(anaplastic large cell lymphoma)이다.

[0017] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 세포를 미니백터와 접촉시키는 단계를 포함하는 세포에서 유전자를 발현시키는 방법으로서, 상기 미니백터는 핵산 서열을 코딩하고, 상기 핵산 서열은 유전자를 발현시키는 것인 방법에 관한 것이다. 일 실시양태에서, 핵산 서열은 유전자를 포함한다. 또다른 실시양태에서, 세포는 포유동물(예, 인간) 세포이다.

도면의 간단한 설명

[0018] 동일 참조 문자는 다른 도면 전반에 걸쳐 동일 부분을 뜻하는 첨부 도면에 도시한 바와 같이, 이전의 설명은 본 발명의 실시양태에 대한 다음의 보다 구체적인 설명으로부터 명백할 것이다. 도면의 크기 조정은 필요한 것은 아니나, 대신에 본 발명의 실시양태를 예시할 때 강조는 필요하다.

도 1은 유전자 침묵(gene silencing)을 위한 shRNA를 코딩하는 미니백터의 제조를 도시한다. shRNA를 코딩하는 합성된 올리고 DNA를 H1 프로모터의 조절하에 개질된 pMC-H1 벡터로 서브클로닝하였다. 인테그라제 매개 재조합을 수행함으로써, 크기가 약 385 bp인 H1 프로모터와 shRNA용 서열만으로 구성된 원형 미니백터를 생성하였다.

도 2는 형질감염이 어려운(hard-to-transfect) 림프종 세포 중에서 미니백터의 높은 세포 형질감염/유전자 침묵 용량을 보여준다. 상위 열에서, 안정한 GFP 발현 부착 293FT-세포에 유전자 침묵을 위한 리포펙타민(Lipofectamine) 방법에 의해 미니백터, 합성 siRNA, 또는 DNA 플라스미드 벡터를 형질감염시켰다. 3일간 배양한 후, 유세포 분석(flow cytometry)을 수행하고 세포 GFP 발현에 대한 평균 형광 농도의 변화를 미처리 세포의 농도 변화(100%)와 비교하였다. 하위 열에서, 형질감염이 어려운 주르카트(Jurkat) 세포(ATCC, Manssa, VA, USA) 유래 인간의 T-림프종/백혈병 세포주에서 또한 동일한 세트의 처리를 수행하고 세포 GFP 발현의 생성 변화를 계산하였다.

도 3A-B는 카르파스(Karpas) 299 세포(German resource center for biological material(DSMZ) 유래 인간의 ALCL 세포주)의 미니백터 유도 ALK 유전자 침묵 및 증식 정지를 보여준다. 도 3A는 세포 ALK 유전자의 침묵을 보여준다. 유효 치료적 가치를 입증하기 위해, 형질감염이 어려운 카르파스 299 세포에 pMC 벡터 대조군, 비관련 대조군 siRNA, 종래의 pMC-H1-ALK/shRNA 플라스미드 벡터, ALK 미니백터, 및 ALK에 특이적인 합성 siRNA로 형질감염시켰다. 4일간 형질감염시킨 후, FITC 결합 항-ALK 항체에 의한 유세포 분석에 의해 세포 ALK 융합 단백질 발현을 시험하고 세포 ALK 단백질에 결합한 항체의 평균 형광 농도에 의해 계산하였다. 도 3B는 림프종 세포 증식의 억제력을 보여준다. 한편, 세포 형질감염 4일에 MTT-세포 증식 분석에 의해 세포 증식의 생성 변화를 또한 동시에 연구하였다. 각 처리에 의한 세포 중 상대 증식률을 그래프로 도시하였다(** P<.01).

도 4는 GFP에 대한 shRNA를 코딩하는 미니백터에 의한 침묵 GFP를 보여준다. GFP를 안정하게 발현하는 293FT-세포에 3 시간 동안 미니백터로 형질감염시켰다. 형질감염 후 지정 시간에 세포를 수집하고 형광 현미경 검사법(데이터 미도시)과 유세포 분석을 동시에 하였다.

도 5는 비바이러스성 미니백터의 개략도를 보여준다. 초나선화된(초나선형)(supercoiled) 미니백터 DNA는 미니서클(minicircle)(Fogg et al. 2006), H1 RNA 프로모터, 및 짧은 헤어핀(hairpin) RNA(shRNA)을 생성하는데 사용된 방법으로부터 잔류 attR 부위를 함유한다. 유전자 발현을 조절하기 위해, 인간의 RNA 폴리머라제(II 또는 III)가 미니서클을 shRNA로 전사하는 핵으로 미니서클을 취한다. 효소 다이스어(dicer)가 처리하는 세포질로 shRNA를 유출한다. 이어서, RISC 복합체가 센스 가닥을 대체하고 siRNA의 나머지 안티센스 가닥을 이용하여 mRNA를 표적화하고, mRNA 분해와 유전자 침묵을 유도한다. shRNA는 또한 miRNA를 코딩하여 유전자의 클래스를 조절한다.

도 6A-E는 인간의 림프종 세포에서 GFP 침묵을 위한 벡터 비교를 보여준다. GFP를 안정하게 발현하는 인간의 카르파스 299 림프종 세포에 리포펙타민 2000을 이용하여 GFP를 침묵시키도록 코딩하는, 종래의 플라스미드 벡터(C), 미니백터(D), 또는 합성된 shRNA(E)로 형질감염시켰다. 형질감염 4일 후에 세포를 수집하여 유세포 분석을 수행하였다. 처리 세포(백색 피크)와 미처리 세포(회색 피크) 사이에서 GFP 발현 변화를 비교하였다. 대조군으로서, 관련없는 shRNA(도 7B)와 삽입체가 없는 pMC 벡터(도 7A)를 사용하였다.

도 7A-B는 향상된 유전자 발현에서 미니백터 결과와 함께 인간의 수지상 세포와 T-세포의 형질감염을 보여준다. 인간의 미숙 DC(도 7A) 또는 CD2/CD28 활성화 T-세포(도 7B)에 모의(Co), 종래, 정상(Reg) 플라스미드, 또는 GeneJuice를 이용하여 GLuc를 코딩하는 미니백터로 형질감염시켰다. 형질감염 후, 성숙 칵테일(cocktail)을 DC에 첨가하였다. 형질감염 48 시간 후에 발광도(RLU, Random Light Unit)에서 루시퍼라제 활성을 측정하였다. 2개의 독립 시편(회색 및 흑색)의 정상 플라스미드와 비교하여 미니백터가 있는 세포에 더 높은 유전자 발현이 존재하였다.

도 8A-B는 길이 함수로서 DNA 전단(shearing)을 요약한 그래프이다(3개 이상의 별개 시편에 대한 평균)(도 8A). 곡선은 S자상 함수에 적합성을 나타낸다. 각 DNA 벡터에 대해 분무 생존 시간을 측정하였다. 벡터의 50%가 생존하는 시간 (생존₅₀(Neb))의 그래프를 그렸다(도 8B). 각 생존₅₀(Neb) 수치는 3개 이상의 별개 시편의 평균이다. 오차 바는 표준 편차를 나타낸다.

도 9A-B는 DNA 생존에 대한 DNA 토폴로지(topology)의 영향을 도시한다. 도 9A는 플라스미드 DNA(1,873 bp)의 토폴로지가 분무 중에 그의 생존에 어떻게 영향을 미치는 지를 보여준다. 각 시점에서 각 토폴로지의 DNA 벡터 분율이 도시된다. 원형 플라스미드는 선형 DNA 보다 훨씬 오랜 동안 지속되었다. 초나선은 전단력에 대해 추

가 저항성을 제공하였다. 도 9B는 미니백터 DNA(385 bp)의 토폴로지가 초음파처리(sonication) 중에 그의 생존에 어떻게 영향을 미치는 지를 보여준다. 도 9A와 동일하게 DNA 분율을 정량화하였다. 초나선형 미니백터 DNA는 닉킹(nicked)되거나 선형인 DNA 보다 상당히 오랜 동안 생존하였다.

도 10은 초나선형 미니백터에 화학 부분의 부착 공정을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 명세서에서 기술한 발명, 유전자 발현의 변경(유전자의 발현 침묵 또는 유전자 발현의 초래를 포함)에 사용하기 위한, 이를테면 유전자 치료를 위한 미니백터 DNA의 전망은 흥미진진하다. 원형 DNA가 세포 중에 지속하고 있으므로, 연속적인, 재생가능한 shRNA 또는 miRNA 또는 도입 유전자 발현이 가능하다. 본 명세서에서 기술한 발명은 박테리아 서열이 거의 완전히 결핍되어 있는, 신규한 비바이러스 유전자 치료 백터, 미니백터 DNA, 소형의, 초나선형 DNA 백터에 관한 것이다. 이들의 소형 크기로 인해, 이들 미니백터가 고효율로 형질감염된다. 박테리아 서열의 결핍은 플라스미드 DNA 백터에 관한 침묵 및 면역 반응 없이 지속적인 도입 유전자 발현이 가능하다.
- [0020] 제1의 일예에서, 미니백터를, 프로모터와 shRNA가 유전자 침묵을 매개하도록 코딩하는 서열을 포함하는 최소 구조물(construct)을 전달하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. RNA 간섭 매개 유전자 침묵은 별도로 합성된 소형 간섭 RNA를 전달함으로써 도입될 수 있다. 이들 RNA는 주변 뉴클레아제에 매우 민감하나, 매우 일시적인 반응만을 나타내며 따라서 이들의 치료 가치를 없앤다. 비교하여, DNA 백터는 생물학적 환경에서 비교적 안정하다. 따라서, 별도 수단으로서 shRNA를 발현할 수 있는 DNA 백터 시스템이 유전자 표적 치료를 위해 개발된 바 있다⁵. shRNA를 코딩하는 DNA 백터는 합성된 siRNA에 의해 달성된 세포 효과보다 상당히 긴 세포 효과를 가지며 표적화 유전자는 수개월 동안 하방 제어될 수 있다⁶. 더구나, 유도성 shRNA 발현 시스템은 DNA 백터를 더 다루기 쉽게 한다⁷.
- [0021] 그러나, 미니백터는 shRNA(또는 miRNA)용 비히클인 것에 한정되지 않는다. 큰 항생제 내성 유전자와 복제 기점을 필요로 하지 않는 것으로 인한 융통성 때문에, 미니백터는 작은 유전자(이 경우 가우시아 루시페라제(*Gaussia luciferase*))를 함유하도록 유전자 조작될 수 있고 프로모터는 소형 크기를 유지한다(예를 들어, 유전자 치료를 위한 기능 유전자를 갖는 플라스미드 보다 훨씬 작은, 약 2000 bp 미만). 미니백터를 인간의 수지상 세포와 T-세포로 코딩하는 가우시아 루시페라제의 형질감염은 동일한 유전자와 플라스미드를 함유한 정상 플라스미드와 비교하여 훨씬 큰 유전자 발현을 얻었다. 이들 결과는 두 가지 중요한 사실을 보여준다. 첫째, 미니백터는 기능 단백질로 전사되고 번역될 수 있는 작은 유전자를 전달하는데 사용될 수 있다. 둘째, 이들 백터의 큰 가능성을 입증하면서, 미니백터는 비바이러스 형질감염이 이전에 거의 내지는 전혀 성공하지 못했던 수지상 세포와 T-세포를 형질감염시킬 수 있다.
- [0022] 또한, 미니백터는 질병이 있는 장기에 미니백터를 표적화하는 유전자 치료의 주요 과제를 극복한다. 예를 들어, 폐는 쉽게 접근될 수 있으므로 유전자 치료를 잘 받아들이지만, 약물 전달을 위해 에어로졸을 생성하는 분무화는 광범위한 전단을 야기하고, 플라스미드 DNA와 같은 백터를 효과가 없게 한다. 그러나, 미니백터는 심지어 축합제의 부재하에서도 분무시 전달력을 견디며, 폐 조직에 표적화 전달을 위한 효능을 나타낸다.
- [0023] 초나선형 DNA 미니서클과 미니서클의 제조 방법이 본 발명에서 전적으로 원용되는, 제키드리치(Zechiedrich) 외 공동발명자의 미국특허출원 제11/448,590호(미국공개번호 US20070020659A1)(제목: "Generation of Minicircle DNA With Physiological Supercoiling")에 기재된 바 있다. 유전자 치료 적용예에 대해, 초나선형 미니서클은 본 명세서에서 "미니백터"로서 지칭된다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 미니백터를 시험한 후 생물학적 안정성, 높은 세포 형질감염률, 높은 유전자 침묵 용량이 있다는 것을 알아냈고 유전자 치료에서 치료 가능성이 있음을 알아냈다. 본 명세서에서 기술된 지견은 미니백터가 유전자 치료를 위한 이점을 가진다는 사실을 나타낸다.
- [0024] 본 명세서에서 사용된 "미니백터"는 미니 크기의 원형 DNA 백터 시스템(미니서클)을 의미하며 이전에 본 발명에서 전적으로 원용되는, 제키드리치(Zechiedrich) 외 공동발명자의 미국특허출원 제11/448,590호(미국공개번호 US20070020659A1)(제목: "Generation of Minicircle DNA With Physiological Supercoiling")에 기재된 바 있다. 미니백터는 인테그라제 매개 생체 내 부위 특이 재조합에 의해 이. 콜리(*E. coli*) 중에서 얻어지는 초나선화된 원형 DNA 분자이다. 예를 들어, 미니백터는 단지 도입 유전자 발현 카세트를 가진 핵산 분자(프로모터와 핵산 서열을 포함하며, 여기서 핵산 서열은 예를 들어, 특이 mRNA 전사산물로 표적화된 shRNA를 코딩하는 서열

일 수 있거나, 특이 단백질의 발현을 코팅하는 유전자일 수 있음)를 함유하고, 중요하게는, 박테리아 유래 서열을 함유하지 않는다^{8,9,10}.

- [0025] 유전자 치료에 사용하는 미니백터는 크기가 약 100 염기쌍(bp) 내지 약 2.5 킬로 염기(kb), 이를테면 약 200 bp 내지 약 2.2 kb, 예를 들어 약 300 bp 내지 약 2.0 kb, 예를 들어 약 400 bp 내지 약 1.9 kb, 예를 들어 약 500 bp 내지 약 1.8 kb, 예를 들어 600 bp 내지 약 1.7 kb, 예를 들어 약 700 bp 내지 약 1.6 kb, 예를 들어 약 800 bp 내지 약 1.5 kb, 예를 들어 약 900 bp 내지 약 1.4 kb, 예를 들어 약 1 kb 내지 약 1.3 kb, 예를 들어 약 1.1 kb 내지 약 1.2 kb인 이중 가닥의, 원형 DNA 분자이다. 미니백터는 크기 증분량이 약 100 bp 이하일 수 있다.
- [0026] 미니백터는 바람직하게는, 예를 들어 화학 부분(chemical moiety)을 이용하여 표지화될 수 있다. 대표적인 표지는 형광물질, 바이오틴, 콜레스테롤, 염료, 개질된 염기 및 개질된 주쇄를 포함한다. 대표적인 염료는 6-카르복시플루오레세인, 5-/6-카르복시로드민, 5-/6-카르복시테트라메틸로드민, 6-카르복시-2',-4',-4'-,5'-,7-,7'-헥사클로로플루오레세인, 6-카르복시-2',-4-,7-,7'-테트라클로로플루오레세인, 6-카르복시-4'-,5'-디클로로-2'-,7'-디메톡시플루오레세인, 7-아미노-4-메틸쿠마린-3-아세트산, 캐스케이드 블루(Cascade Blue), 마리나 블루(Marina Blue), 패시픽 블루(Pacific Blue), Cy3, Cy5, Cy3.5, Cy5.5, IRDye700, IRDye800, BODIPY 염료, 텍사스 레드(Texas Red), 오레곤 그린(Oregon Green), 로드민 레드, 로드민 그린을 포함한다. 추가 변형체는 또한 개질된 염료(예, 2-아미노푸린, 메틸화 염기), 또는 개질된 주쇄(예, 포스포로티오에이트, 여기서 비가교 산소 중 하나는 황에 의해 치환됨; 2'-O-메틸-RNA-올리고뉴클레오티드; 메틸-포스페이트 올리고뉴클레오티드)을 포함할 수 있다. 화학 부분 및/또는 개질된 염기 및/또는 개질된 주쇄를 비롯한, 다중 표지가 필요한 경우 동시에 사용될 수 있다. 뉴클레오티드를 표지화하는 방법은 예를 들어, 문헌[참조: "Nucleic Acid Probe Technology" by Robert E. Farrell; RNA Methodologies (3판), 2005, pp. 285-316; 및 "Enzymatic Labeling of Nucleic Acids" by Stanley Tabor and Ann Boyle, Current Protocols in Immunology 2001 May; Chapter 10: Unit 10.10]에 기재되어 있다. 이들 참조문헌의 교시는 본 명세서에서 전적으로 원용된다.
- [0027] 본 명세서에서 사용된, 용어 "RNA 간섭" 또는 "RNAi"는 침묵 유전자 서열에 상동인 RNA에 의해 서열 특이적인, 전사 후 유전자 침묵이 개시되는 프로세스를 의미한다. RNAi는 식물 내지 인간인, 광범위한 생물체와 이들의 세포에서 일어나며, 또한 전사 후 유전자 침묵(PTGS) 및 다른 생물계에서 동시 억제로서 지칭된 바 있다. RNA에서 관찰된 mRNA의 서열 특이 분해는 작은(또는 짧은) 간섭 RNA(siRNA)에 의해 매개된다.
- [0028] 본 명세서에서 사용된, 용어 "간섭 RNA"는 적어도 일부가 간섭 RNA의 서열과 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열을 가진 RNA 전사물의 분해를 RNA 간섭(RNAi) 메커니즘을 통해 지시할 수 있는 RNA 분자를 의미한다. 본 기술에 공지된 바와 같이, 간섭 RNA는 분자 간 두 가닥을 형성하는 2개의 상보 단일 가닥 RNA로 구성된, "작은 간섭 RNA", 또는 siRNA일 수 있다. 간섭 RNA는 또한 RNA가 그 자체에 포개게 하고 분자 간 두 가닥 영역과 짝이 없는 루프 영역을 가진 스템 루프(stem-loop) 구조를 형성하게 하는 2개의 자기 상보적 영역이 있는 단일 가닥 RNA로 구성된, "짧은 헤어핀 RNA", 또는 shRNA일 수 있다.
- [0029] 본 명세서에서 사용된, 용어 "유전자 침묵"은 표적 유전자의 발현 생성물 감소를 의미한다. 침묵은 최종 유전자 생성물이 생성되지 않는다는 점에서, 또는 부분적으로, 유전자 생성물의 양에서 실질적인 감소가 일어난다는 점에서 완료될 수 있다.
- [0030] 본 명세서에서 사용된, 포유동물은 영장류(예, 인간), 젖소, 양, 염소, 말, 돼지, 개, 고양이, 토끼, 기니아 피그, 쥐, 생쥐 또는 기타 소, 양, 말, 개, 고양이, 설치류 또는 쥐 종을 포함하나, 이들에 한정되지 않는, 동물을 의미한다. 일 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.
- [0031] 본 명세서에서 사용된, 포유동물 세포는 영장류(예, 인간), 젖소, 양, 염소, 말, 돼지, 개, 고양이, 토끼, 기니아 피그, 쥐, 생쥐 또는 기타 소, 양, 말, 개, 고양이, 설치류 또는 쥐 종을 포함하나, 이들에 한정되지 않는, 동물 유래 세포를 의미한다. 일 실시양태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다.
- [0032] 용어 "치료"(treating)는 치료적 처치(treatment) 및 예방적 처치 둘 다 포함한다(성장 가능성 감소). 이 용어는 질병(예, 본 명세서에서 기술된 질병 또는 장애)의 성장 또는 진행 감소, 억제, 약화, 축소, 정지, 또는 안정을 의미하거나, 질병의 중증도를 줄이거나 질병과 연관된 증상을 개선하는 것을 의미한다.
- [0033] 본 명세서에서 기술한 바와 같이, 유전자 치료에 사용하는 미니백터는 유효량으로 존재한다. 본 명세서에서 사용된, 용어 "유효량"은 적합한 투여 계획으로 투여될 때, 표적 장애를 치료하는데(치료적으로 또는 예방적으로) 충분한 양을 의미한다. 예를 들어, 유효량은 치료 장애의 기간 또는 진행에 중증도를 감소시키거나 개선하는데

충분하며, 치료 장애의 발전을 방지하거나, 치료 장애의 퇴행을 야기하거나, 다른 요법의 예방적 또는 치료적 효과를 향상시키거나 개선하는데 충분하다.

- [0034] 본 명세서에서 기술한 바와 같이, H1 프로모터와 유전자 치료를 위해 shRNA를 코딩하는 서열로 구성된 원형 DNA 미니백터 시스템을 시험하였다. 미니백터 시스템의 생물학적 안정성, 세포 형질감염률, 및 유전자 침묵 용량을 종래의 DNA 플라스미드 백터 및 합성된 siRNA와 비교하였다. 또한, 미니백터의 치료 가능성을 형질감염이 어려운 현탁 주르카트(림프종/백혈병) 세포와 카르파스 299(인간의 역형성 대세포 림프종(ALCL)) 세포 중에서 시험하였다. ALCL 세포는 역형성 림프종 키나아제(ALK) 유전자에 관련된 비정상 염색체 전위를 지니고 있다(1-3). 키메라 ALK 융합 단백질의 생성된 비정상 발현(4-6)은 ALCL 성장에 대해 중요한 발명 인자라고 알려진 바 있다(7-9). 본 연구에서, 세포의 ALK 유전자 발현과 림프종 세포 성장에 대한 미니백터의 효과를 동시에 시험하였다.
- [0035] 생물학적 안정성 분석은 미니백터가 인간의 혈청에서 24 시간 이상 안정하였고, 비교하여, 합성된 siRNA는 4 시간 배양 후 완전히 절단되었다. 세포 형질감염 연구를 위해, GFP shRNA를 코딩하는 미니백터를 리포펙타민 방법론에 의해 안정한 GFP 발현 세포로 도입하였다. 유세포 분석으로 미니백터의 형질감염이 293FT-세포(52% 감소) 및 형질감염이 어려운 주르카트 현탁 림프종 세포(46% 감소) 둘 다에서 중요한 GFP 유전자 침묵을 유발할 수 있다는 사실이 밝혀졌다. 잠재적 치료 가치를 시험하기 위해, 인간의 역형성 큰 세포 림프종(ALCL)의 중요한 병원성 인자인, 역형성 림프종 키나아제(ALK) 유전자의 침묵을 위해 미니백터를 생성하였다. 배양된 카르파스 299 ALCL 세포에 미니백터, 종래의 플라스미드 백터, 및 합성된 siRNA로 형질감염시키고, 생성된 유전자 침묵을 FITC 결합 항-ALK 항체로서 유세포 분석에 의해 관찰하였다. ALK 단백질 발현의 상당한 감소가 합성 siRNA(26% 감소)뿐 아니라 미니백터(25% 감소)로 형질감염된 세포에서 검출되었고, 종래의 플라스미드(0.8% 감소)에 의해 유도된 것보다 30 배 더 높았다. 또한, 동시 MTT 분석으로 미니백터 또는 합성 siRNA에 의해 유도된 ALCL 세포의 상당한 성장 정지($P < .01$)를 입증하였으나, 종래의 플라스미드는 입증하지 못했다. 미니백터 시스템이 혈청에서 안정하고 높은 세포 형질감염 용량을 가진다는 지견을 나타내며, 특히 형질감염이 어려운 세포에서 생체 내 유전자 치료를 위한 잠재적 가치를 시사한다.
- [0036] 또한 본 명세서에서 기술한 바와 같이, 300 염기쌍 이하에서 5,000 염기쌍 이상까지의 미니백터에 분무기 또는 초음파를 통해 에어로졸화에 의해 생성된 전단력을 받게 하였다. 초나선화 및 길이 둘 다 전단력 생존에 상당한 영향을 주었다. DNA 초나선화는 전단으로부터 DNA를 보호하였다. 흥미롭게도, 닉킹된(nicked) 분자는 이완된 무손상 DNA와 동일하게 부러졌다. DNA 전단은 DNA 길이에 역상관 관계에 있으며; DNA가 짧아수록, DNA는 전단에 더 내성이 있다. 심지어 축합제의 부재하에서, 1,200 염기쌍 미만의 초나선 DNA는 일부 요법에 대해 전형적인 치료 계획 시간과 동일한 시간 동안 생존하였다. 이들 결과는 유전자 치료를 위해 표적화 전달에 미니백터의 잠재적 가치의 징후를 제공한다.
- [0037] 유전자 치료 적용예에 더하여, 또한 DNA 초나선화, DNA 초나선화 의존 별도 구조체, 또는 DNA 초나선화 의존 단백질 메커니즘을 연구하는데 미니서클을 사용할 수 있다. 예를 들어, 59 CAG 반복 영역을 포함한, 질환 유전자 좌(disease locus), 척수 소뇌성 실조증 타입 1 유래 서열을 함유한 삽입체를 582 bp 미니서클에 클로닝하였다. T7 엔도뉴클레아제 I에 의한 제한적이지만 상당한 양의 분할이 높은 초나선화 수준에서 검출되었고, 초나선 안정화 별도 구조체의 존재를 시사하였다.
- [0038] 또한 DNA 국소이성화 효소를 표적화하는 항생제 및 항암 약물의 메커니즘을 평가하는 분석으로 미니서클을 사용할 수 있다. 추가로, 질병 및 인간의 수지상 세포와 인간의 T-세포의 유전자 수식에 연관된 유전자를 조절하는데 미니서클을 사용할 수 있다.
- [0039] 본 명세서에서 기술된 모든 실시양태에서, 광범위한 세포 유형 또는 생물체를 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기한 포유동물을 사용할 수 있다. 별도로, 박테리아, 고세균류, 및 진핵생물(예, 식물)를 비롯하여, 다른 형태의 세포/생물체를 사용할 수 있다.
- [0040] 본 명세서에서 기술된 모든 실시양태에서, 또한 다중 표적이 있는 미니백터뿐 아니라 단일 시스템에서 다중 형태의 미니백터를 사용할 수 있다. 예를 들어, 각 별개 미니백터가 단일 단백질의 부분 또는 영역을 포함하는 다른 핵산 서열을 코딩하는, 2개(또는 그 이상)의 별도 미니백터를 디자인할 수 있으며, 별개 미니백터가 단일 세포에서 발현될 때, 부분 또는 영역이 함께 단일 활성 단백질을 형성하도록 한다. 또한, 미니백터의 중합체 형태는 생체 내 재조합 중에 형성될 수 있다. 더구나, 다중 치료적 shRNA를 코딩하는 서열을 삽입하여 형질감염된 세포에서 동시 다유전자 표적 가능성이 있는 미니백터를 생성할 수 있으며, 감도가 높고 특이성이 높은 유전자 치료를 얻는다.

- [0041] 본 발명의 실시양태에 대한 설명은 다음과 같다.
- [0042] 실시예
- [0043] 실시예 1: 세포 형질감염 및 유전자 침묵
- [0044] 물질 및 방법
- [0045] **올리고뉴클레오타이드 합성 및 미니벡터 제조**
- [0046] GFP 침묵을 위해서, 합성 siRNA는 쌍으로 된 대조군 siRNA와 함께 구입하였다(카탈로그 번호 AM4626, 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 Ambion으로부터 구입됨). ALK 유전자를 위한 siRNA는 센스: (서열 번호: 1) 5'-CACUUAGUAGUGUACCGCctt-3' 및 안티센스: (서열 번호: 2) 5'-GGCGGUACACUACUAAGUGtt-3'을 지닌 Ambion에 의해 보고된 서열¹¹에 따라 합성하였다. shRNA 발현 미니벡터를 발생시키는데 사용된 모체 플라스미드는 다음과 같이 하여 발생시켰다. KasI 및 HindIII 제한 부위를 pMC339-BbvCI 내로 조작하였다(Fogg et al. 2006). KasI 부위와 HindIII 부위 사이에 pSUPER-CCR5shRNA-3(refs)으로부터 유래된 shRNA 발현 서열 및 KasI/HindIII 단편 함유 H1 프로모터를 삽입함으로써 pMC 벡터 내로 H1 프로모터를 서브클로닝하였다. 이어서, shRNA 발현 서열의 전방 내에 BglII 부위를 조작하여 pMV-CCR5shRNA3-BglII를 발생시켰다. 이는 shRNA 발현 서열이 BglII 부위와 HindIII 부위 사이에 삽입에 의해 이하에 교환될 수 있게 한다(도 1). GFP shRNA를 5'-GATCCCCGCAAGCTGACCTGAAGTTCTTCAAGAGAGAACTTCAGGGTCAGCTTGCTTTTA¹²의 센서 서열로 코딩하고 ALK shRNA를 5'-GATCCCCGAGTTGGTCATTGCGAGGATGCCATTTCAAGAGAATGGTATCCTCGTAATGACCAGCTCTTTTA의 센서 서열로 코딩하는 DNA 인서트(Ito M, Zhao N, Zeng Z, Chang CC, Zu Y. Cancer Gene Ther 2010; 17: 633-644.)는 2가지 올리고뉴클레오타이드로서 각각 합성하고, 어닐링하여 서플렉스를 형성시키며, 그리고 BglII 부위와 BamHI 부위 사이에 H1 프로모터 조절 하에 변형 pMV 벡터 내로 서브클로닝하였다(도 1). 결과로 생성된 플라스미드는 pMV-H1-GFPshRNA 및 pMV-H1-ALKshRNA라고 칭하였다. 미니벡터 DNA 모체 플라스미드를 이. 콜리 균주 LZ54(Zechiedrich et al. (1997), Genes Dev. 11, 2580-2592) 내로 형질전환시키고, 매개된 대규모의 λ-인테그라제(Int)를 이어지는 최소한 변형으로 앞에서 설명한 바와 같이 수행하였다¹³. 겔 세파크릴 S-500 여과(GE Healthcare Life Sciences, 뉴저지주 피스캐트웨이 소재)의 복수의 순환에 의해 순수한 초나선형 단량체 미니벡터 DNA를 분리하였다. 미니벡터의 초나선형 단량체 형태만을 유전자 침묵 연구에 사용하였다. 플라스미드 명칭의 앞부분에 "p"를 배치하는 관례에 따라, 미니벡터 DNA를 "mv"로 지정하고, 미니벡터를 발생시키는데 사용된 모체 플라스미드를 "pMV"로 지정한다.
- [0047] **생물학적 안정성 검증**
- [0048] GFP shRNA를 코딩하는 발생된 미니벡터(1 μg) 뿐만 아니라 동질량 양의 모체 플라스미드 pMV-H1-GFPshRNA 및 합성 GFP siRNA를 37°C에서 100% 인간 혈청(Atlanta Biological Inc., 조지아주 로렌스빌 소재) 100 μl 중에서 항온 처리하였다. 다양한 시점에서, 잔기 DNA 벡터 또는 siRNA 생성물을 페놀:클로로포름:이소아밀 알콜 (25:24:1)로 추출하고, 클로로포름으로 추출하며, 그리고 95% 에탄올 중에 침전시켰다. 이어서, 잔기 RNA 및 DNA 생성물을 10% 폴리악릴아마이드 및 1.5% 아가로스 겔 상에서 각각 검사하고, 이어서 에티듐 브로마이드 염색을 수행하였다. DNA 또는 siRNA 생성물의 밴드는 TotalLab 소프트웨어(FotoDyne Inc., 위스콘신주 하트랜드 소재)를 이용하여 정량화하고, Kaleidagraph(Synergy Software, 펜실베이니아주 레딩 소재)를 이용하여 도시하였다.
- [0049] **세포 형질감염 및 유전자 침묵**
- [0050] GFP 유전자 침묵을 위한 리포터 시스템으로서, 유착 293FT 세포(형질전환된 인간 배아 신장 세포주, Invitrogen) 및 형질감염시키기 어려운 주르카트 세포(hard-to-transfect Jurkat cell)(인간 백혈병/림프종 세포주)로부터 유래된 안정한 GFP-발현 세포를 확립하였다. 이 GFP-발현 세포는 제조사 사용설명서(Invitrogen, 캘리포니아주 칼스배드 소재)에 따라 리포펙타민 방법론을 이용하여 DNA 벡터 또는 siRNA에 의해 형질감염시켰다. 결과로서 생기는 세포 GFP 발현의 침묵은 3일째에 유세포 분석기를 이용하여 정량화하였고, 데이터를 FlowJo 소프트웨어(BD Biosciences, 캘리포니아주 산 호세 소재)로 분석하였다. 세포 GFP의 평균 형광성 세기는 대조군으로서 미처리된 세포를 사용하여 계산하였다(%).

[0051] 게다가, 배양된 카르파스 299 세포(인간 ALCL 세포주)는 상기 설명된 바와 같이 합성 ALK siRNA 및 대조군 siRNA, pMV-H1 벡터, pMV-H1-ALKshRN A, 또는 ALK 미니벡터(mv-H1-ALKshRNA)로 형질감염시켰다. 세포를 3일째에 수집하고, 고정하며, 제조사 사용설명서에 따라 세포 제조 키트(BD Biosciences)를 이용하여 투과하였다. 세포 ALK 융합 단백질은 FITC-공역화 안티-ALK 항체(1:20 희석, BD Biosciences)로 염색하였고, 유세포 분석기로 정량화하였다.

[0052] MTT 세포 증식 검정

[0053] 세포 ALK 유전자 침묵으로서, 세포 성장/증식에서의 변화를 동시에 검사하였다. 형질감염된 카르파스 299 세포의 분취량(aliquot)(100 μ l/샘플)을 96 웰 플레이트에 옮기고, MTT 검정용 키트(Chemicon International, 캘리포니아주 테메쿨라 소재)의 검정용 버퍼 10 μ l와 혼합하며, 37°C에서 4 시간 동안 항온 처리한 후, 제조사 사용설명서에 따라 용해하였다. MTT 세포 증식 검정은 각 견본에 있어서 OD₅₀에서 검출된 흡광도에 의해 BioRad 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 분석하였다. 상대적 세포 성장(%)은 배경 대조군으로서 미처리된 세포를 사용하여 계산하였다. 모든 실험은 3회 이상 수행하고, 결과는 평균 \pm 표준 편차로 나타내었다.

[0054] 결과

[0055] 미니벡터는 인간 혈청에서 안정하였다.

[0056] 미니벡터를 발생시키기 위해서, GFP 유전자 또는 ALK 유전자에 특이적인 shRNA를 코딩하는 합성 올리고 DNA를 변형 pMV-H1 모체 플라스미드 내로 서브클로닝하였다(도 1)¹³. 생체내 인테그라제-매개 재조합을 수행함으로써, 원형 미니벡터, ~385 bp, 헛(hat)은 H1 프로모터를 거의 함유하지 않고, 박테리아 서열이 거의 완전 없는 shRNA에 대한 서열을 얻었다. 유전자 침묵 연구에 있어서, 미니벡터의 단량체의 초나선화된 형태를 분획화하고 정제하였다.

[0057] 생물학적 안정성 연구에 있어서, 정제된 GFP 미니벡터를 100% 인간 혈청 중에서 37°C에서 3일 동안 항온 처리하였다. 대조군에서는, 모체 pMV-GFPshRNA 벡터 및 합성 GFP siRNA를 동일 조건에서 시험하였다. 다양한 시점에서, 잔기 DNA 벡터 및 합성 siRNA를 추출하였고, 전기영동에 의해 분석하였다. 그 미니벡터는 48 시간 이상 동안 인간 혈청 중에 안정하였고, 반면에 벡터의 모체 플라스미드 DNA는 ~ 4 시간 후에 50% 이상 분해되었다. 대조적으로, 합성 siRNA는 30분 내에 분해되었다.

[0058] 형질감염이 어려운 림프종 세포에서 미니벡터의 고 유전자 침묵 효능

[0059] 유전자 침묵에 대한 세포 형질감염 가능성을 평가하기 위해서, 유착 293 FT 세포(형질전환된 인간 신장 섬유아 세포 세포주)로부터 그리고 현탁 카르파스 299 세포(인간 ALCL 세포주)로부터 안정한 GFP-발현 세포의 2가지 유형을 유도하였다. GFP-발현 세포는 리포펙타민 방법론을 이용하여 GFP 미니벡터로 형질감염시키고, 결과로서 생기는 세포 GFP 발현에서의 변화를 "물질 및 방법"에서 설명된 바와 같이 3일 동안 형질감염 후에 유세포 분석기로 정량화하였다. 유착 293FT 세포에서, 미니벡터의 형질감염은 pMV-H1-GFPshRNA 플라스미드 벡터에 의해 유도된 것(30%) 및 합성 GFP siRNA에 의해 유도된 것(68%)에 필적할 정도로 유의적인 GFP 유전자 침묵(49%)을 유도하였다(도 2의 상부 열). 흥미롭게도, 형질감염시키기에 어려운 주르카트 세포에서, 미니벡터의 형질감염은 pMV-H1-GFPshRNA 플라스미드 벡터에 의해 유도된 것(4.5%)보다 10배 더 높고 합성 GFP siRNA에 의해 유도된 것(61%)보다 단지 약간 더 낮은 GFP 유전자의 유의적인 침묵(세포 eGFP 발현의 46% 감소)을 결과로 생성하였다(도 2의 하부 열).

[0060] 미니벡터에 의한 ALK 유전자의 침묵은 카르파스 299 림프종 세포의 성장 정지를 유도하였다.

[0061] ALK 융합 단백질의 비정상적인 발현은 ALCL 세포의 성장 억제를 결과로 생성하는 ALK-양성 ALCL 및 siRNA-유도된 ALK 유전자 침묵을 개발하는데 중요한 병원성 인자인 것으로 입증되었다. ALCL에 대한 재적인 치료적 역할을 실증하기 위해서, ALK shRNA를 코딩하는 미니벡터를 형질감염시키기에 어려운 카르파스 299 림프종 세포 내로 형질감염시켰다. 30일 동안 세포 형질감염 후, 결과로서 생기는 ALK 유전 침묵은 상기 설명된 바와 같이 FITC-

공역화된 안티-ALK 항체를 사용하여 유세포 분석기로 세포 ALK 융합 단백질 발현을 정량화함으로써 평가하였다. 미니백터의 형질감염은 합성 ALK siRNA의 형질감염에 의해 유도된 것(27%)만큼 효과적인 세포 ALK 융합 단백질의 발현의 25% 감소로 배양된 카르파스 299 세포에서 ALK 유전자의 유의적인 침묵을 결과로 생성하였다(도 3A). 대조적으로, pMV-H1-ALKshRNA의 종래 플라스미드 백터는 세포 ALK 융합 단백질의 발현의 무시할만한 감소(0.8%)에 이를 정도로, 형질감염시키기에 어려운 카르파스 299 림프종 세포에서 유전자 침묵에 대한 효과를 거의 갖지 못하였다. 발견들에 의하면, 미니백터는 형질감염시키기에 어려운 카르파스 299 림프종 세포에서 ALK 유전자 침묵을 유도하는데 종래의 플라스미드 백터보다 30배 더 효과적인 것으로 나타났다.

[0062] 게다가, 유도된 ALK 유전자 침묵으로부터 결과로 생성되는 세포 효과를 확인하기 위해서, 상응하는 세포 성장을 3일 동안 각각의 처리 후에 동시적으로 검사하였다. 상대적 세포 성장(%)은 "물질 및 방법" 하에 설명된 바와 같이 MTT 세포 증식 검정에 의해 검출하였다. ALK/shRNA 뿐만 아니라 합성 ALK siRNA를 코딩하는 미니백터에 의한 카르파스 299 림프종 세포의 형질감염은 결과적으로 세포 성장의 유의적인 억제 생성하였다(거의 40% 감소 및 $P < 0.01$). 대조적으로, pMC-H1-ALK/shRNA의 플라스미드 백터는 비히클 단독, pMC-H1, 또는 대조군 siRNA에 의해 형질감염된 대조군 세포와 비교했을 때 세포 성장에 대한 검출된 효과를 갖지 못하였다(도 3). 이들을 함께 고려하면, 이러한 발견들은 미니백터가 세포 유전자 침묵, 특히 형질감염시키기에 어려운 세포에서 세포 유전 침묵에 대한 강력한 도구인 것으로 입증해 보여준다.

[0063] 이 연구에서, 유전자 표적화 치료에 있어서 미니백터의 생물학적 안정성 및 잠재적인 사용은 형질감염시키기에 어려운 림프종 세포에서 실증되었다. 발견들에 의하면, 미니백터는 합성 siRNA 및 종래 플라스미드 DNA 백터 양자에 비하여 이점들: (종래 플라스미드 백터에 비하여) 고 세포 형질감염/유전자 침묵 비율 및 인간 혈청 내에서의 높은 생물학적 안정성을 갖는 것으로 입증해 보여준다. 게다가, 미니백터 시스템을 이용하는 것은 또한 종래의 플라스미드 백터의 골격 박테리아 서열로부터 잠재적인 세포독성도 제거한다. 결과들에 의하면, 그 미니백터 시스템은 생체내 유전자 표적화 치료에 유망한 전달 백터임을 제시하여 보여준다.

[0064] 본원에 설명된 바와 같이 원형 미니백터는 거의 전사 프로모터(H1)로만 구성되고, 표적화 유전자를 위한 치료적 shRNA를 코딩하는 서열로 설계되어 있으며, 그리고 생체내 재조합 부위에서 인테그라제 매개된다(도 1). 작은 크기(예를 들면, 본 실시예에서 미니백터는 ~385 bp임)로 인하여, 미니백터는 주어진 부피/질량에 대하여 보다 많은 분자 수 및 종래 DNA 플라스미드 백터의 것보다 더 높은 세포 형질감염 효율을 가질 수 있다. 게다가, shRNA의 카피(copy) 수가 형질감염된 세포에서 H1 프로모터로부터 반복된 유전자 전사를 통해 유의적으로 증폭될 수 있는 가능성도 있다. 대조적으로, 형질감염된 합성 siRNA는 세포에서 카피 수를 증가시킬 수 없다. 합성 siRNA는 또한 RNA-간섭 매개된 유전자 침묵 동안 완전 파괴되므로, 일정한 보충을 필요로 한다. 유전자 침묵을 위한 미니백터의 단량체 형태 이외에도, 미니백터의 중합체 형태가 또한 생체내 재조합에서 형성될 수 있으며, 유사한 기법을 이용하여 정제될 수 있다. 그러한 미니백터의 이량체/중합체 형태는 본원에서 설명된 기법을 이용하여 유전자 침묵 가능성에 대하여 시험할 수 있다. 더구나, 복수의 치료적 shRNA를 코딩하는 서열을 삽입하여, 형질감염된 세포에서 동시적인 다유전자 표적화 가능성을 지닌 미니백터를 생성하는 것도 가능하며, 이는 결과적으로 고도로 민감하고 특이적인 유전자 치료를 생성하게 된다.

[0065] 실시예 2: shRNA를 코딩하는 미니백터는 인간 섬유아세포에서 GFP 발현을 차단한다.

[0066] GFP에 표적화된 shRNA를 코딩하는 미니서클(minicircle shRNA-GFP)의 형질감염 효율은 GFP를 안정하게 발현하는 인간 배아 신장 세포(293FT/GFP)에서 검정하였다. 293PF 세포에서 발견되지 않는 CCR5에 대하여 shRNA를 코딩하는 미니백터는 음성 대조군으로서 작용하였다. 리포펙타민을 사용하여 형질감염을 수행한 후, GFP 발현은 형광성 활성화된 세포 선별(sorting)을 이용하여 정량화하였다. GFP 매개된 형광성에 대한 효과를 갖지 않는 대조군 미니백터에 의해 형질감염된 세포와 비교하여, 미니백터를 수용하는 세포는 용량 및 시간 의존적 방식으로 감소된 형광성을 44% 감소된 형광성으로 나타내었다(도 4). 그러므로, GFP 유전자에 대하여 shRNA를 코딩하는 미니백터는 GFP 발현을 침묵시키도록 도 5에 개략화된 바와 같은 Dicer 경로를 통해 처리된다.

[0067] shRNA를 코딩하는 미니백터는 종래의 shRNA 플라스미드 백터보다 더 효과적으로 주르카트 림프종 세포에서 GFP 발현을 침묵시켰다. GFP를 안정하게 발현하는 인간 카르파스 299 세포를 발생시켰다. 이러한 세포주를 사용하여 미니백터 및 종래 플라스미드의 형질감염 및 침묵 효율을 비교하였다. 미니백터, mv-H1-GFPshRNA(도 6D)는 GFP에 대하여 동일 shRNA를 코딩하는 플라스미드 백터, pMV-H1-GFPshRNA(도 6C)와 비교하였다. 게다가, 합성 siRNA는 DNA 백터에서 사용된 동일 서열로 시험하였다(도 6E).

[0068] 도 6A-6B에서 도시되어 있는 바와 같이, 대조군 pMV-H1 벡터 및 대조군 shRNA를 발현하는 미니벡터는 세포 GFP 발현에 대한 효과를 가지 못하였다. 종래의 플라스미드 벡터 pMV-H1-GFPshRNA에 의한 세포의 형질감염은 처리된 세포의 4.5%로 GFP 유전자 발현을 침묵시켰다(도 6C). 그러나, 미니벡터 처리는 처리된 세포의 46%로 GFP를 침묵시켰는데(도 6D), 이는 올리고머 shRNA에 의해 유도된 것(61%)에 필적하였다(도 6E).

[0069] 실시예 3: 인간 수지상 세포 및 T 세포의 형질감염

[0070] 가우시아 루시페라제(*Gaussia luciferase*)를 코딩하는 미니벡터는 인간 수지상 세포를 형질감염시켰고, 고 효율로 T 세포를 활성화하였다. 종양과 투쟁할 수 있는 활성화된 T 세포의 성능을 측정하기 위해서 임의 시스템을 확립하였다(Ahmed et al. 2007, J Immunother. 30(1):96-107). 짧은 루시페라제 유전자, 가우시아 루시페라제를 미니벡터 내로 클로닝하여 mvGLuc를 만들었다. 이용가능한 가장 작은 용이하게 다루기 쉬운 유전자 중 하나임에도 불구하고, 그 루시페라제 유전자는 결과적으로 비교적 큰 미니벡터 ~ 1.2 kb를 생성하였는데, 이는 상기 GFP 발현의 조절을 보여주는 실험에서 사용된 ~385 bp 미니서클보다 훨씬 더 크다. 그러나, GLuc-코딩 미니서클은 전형적인 DNA 플라스미드 벡터보다 훨씬 더 작고, 중요하게는 선택 또는 복제를 위한 임의 박테리아 서열을 결여하고 있다. 도시된 바와 같이, 인간 수지상 세포(DC)(도 7A) 및 T-세포(도 7B) 내로의 GLuc-전달은 결과적으로 일반적인 플라스미드와 비교하여 보다 높은 유전자 발현을 생성하였다. 이 결과들은 2가지 유의적인 사항을 나타낸다. 첫째, 미니벡터는 전사되어 기능성 단백질로 번역될 수 있는 작은 유전자를 전달하는데 사용될 수 있다. 둘째, 이러한 벡터 중 가장 큰 가능성을 갖는 것으로 입증되었기 때문에, 그 미니벡터는 비바이러스 형질감염이 이전에는 거의 내지 전혀 성공하지 못한 DC 및 T 세포주를 형질감염시킬 수 있다.

[0071] 실시예 4: 마우스 폐에서 가우시아 루시페라제의 활성화

[0072] CMV 프로모터의 조절 또는 다양한 조절 하에 가우시아 루시페라제의 비분비된 형태를 코딩하는 1,613 bp 미니벡터는 이제 교배된(out-bred) 암컷 NIH 스위스 마우스에 비강내로 투여하였다(5 μ g). 그 마우스의 절반에는 수종의 미니벡터(mcGLuc + H₂O)를 제공하였고, 나머지 절반에는 PEI 중의 미니벡터(mcGLuc + PEI)를 제공하였다. 대조군 마우스는 임의의 DNA를 수용하지 않았다. 미니벡터의 후투여 72 시간 후에, 마우스를 치사시키고, 마우스 폐를 수거하였다. 전체 폐는 비드 및 용해 버퍼를 사용하여 균일화하고, 이어서 루시페라제 활성에 대하여 ELISA를 이용하여 검정하였다. 미니벡터는, PEI의 부재 하에서도, 묶인 폐를 형질감염시키고 가우시아 루시페라제를 발현시켰다. 이들 결과는, 일반적으로 독성인 형질감염 비히클이 치료 동안 전혀 필요로 하지 않을 수 있다는 점을 나타내기 때문에, 유의적이다. 추가 실험은 상이한 단백질 또는 shRNA를 발현하는 다른 미니벡터를 사용하여 폐 세포 내의 특정 유전자를 침묵시키는 것 뿐만 아니라 Aerotech II 분무기(nebulizer)를 사용하여 에어로졸화에 의해 미니벡터를 투여하는 것을 포함한다.

[0073] 실시예 5: 미니벡터 상에서의 전단력의 평가

[0074] **물질 및 방법**

[0075] *화학물질, 시약 및 장비*

[0076] 모든 화학물질은 Fisher Scientific(메사추세츠주 월탐 소재)를 통해 구입하였고, 단 아크릴아마이드(EMD Chemicals, Merk KGaA, 독일 다름슈타트 소재), 아가로스(ISC BioExpress, 유타주 케이스빌 소재), 및 SYB(등록상표) Gold(Invitrogen, 캘리포니아주 헤르쿨레스 소재)의 경우에는 예외로 하였다. 모든 제한 효소는 New England Biolabs(메사추세츠주 Ipswich 소재)로부터 구입하였다. Plasmid Maxi 키트는 Qiagen(캘리포니아주 발렌시아 소재)로부터 구입하였고, Amicon Ultra 원심분리 필터는 Millipore(메사추세츠주 빌레리카 소재)로부터 구입하였다. Aerotech II 젯 분무기는 Pharmeducence(메사추세츠주 베드포드 소재)로부터 구입하였고, Aridyne 2000 콤프레서는 Allied Healthcare Products(미주리주 세인트 루이스 소재)로부터 구입하였다. 1/8" 프로브 초음파기(sonicator)(Model 60 Sonic Dismembrator)는 Fisher Scientific(메사추세츠주 월탐 소재)로부터 구입하였다. PC Image 및 Total Lab의 소프트웨어 프로그램은 Fotodyne(위스콘신주 하트랜드 소재) 및 TotalLab(노스캐롤리나주 두햄 소재)로부터 각각 구입하였다.

[0077] DNA 생성 및 조작

[0078] 281 bp에서 5,302 bp에 이르는 광범위한 크기를 포함하는 다수의 플라스미드 및 미니백터는 Aerotech II 분무기에 의한 에어로졸화를 통해 발생된 전단력 또는 초음파 처리를 통해 발생된 전단력으로 처리하였다. 텍스트 전반에 걸쳐, 이러한 백터는 길이가 평가되고 있는 주요 변수이기 때문에 그 길이에 의한 것만 언급되어 있다. 플라스미드 명칭의 앞부분에 "p"를 사용하는 관례에 따라, 미니백터(상표명) DNA는 "mv"로 지정된다. 미니백터(상표명) DNA를 발생시키는데 사용된 모체 플라스미드는 "pMV"로 지정된다. 모체 플라스미드, pMV-KB4TAL-GLucDEL 및 pMV-CMV-GLucDEL는 데이비드 스펜서 박사(Baylor College of Medicine)으로부터 기증된 것이고, pMV-KB4TAL-mCherry 및 pMV-CMV-mCherry는 마틴 마주크 박사 및 켄넬 유 박사(Baylor College of Medicine)로부터 기증된 것이었다. pQR499는 존 워드 박사(University College London, U.K.)로부터 기증된 것이었다. pDJC1는 pQR499를 TfiI 및 AflIII로 분해하여 구성하였다. 분해된 pQR499의 오픈 말단은 T4 DNA 폴리머라제에 의해 채워 넣고, 이어서 T4 DNA 리가제로 결찰하였다. 플라스미드는 E. coli DH5α 세포에서 발생시키고, 제조자 사용설명자에 따라 Plasmid Maxi 키트를 사용하여 단리하고, 이어서 탈염 처리하며, 그리고 Amicon Ultra 원심분리 필터를 사용하여 농축하였다. 미니백터 DNA를 다음과 같이 얻었다. 미니백터 모체 플라스미드를 이. 콜리 균주 LZ54(Zechiedrich et al. 1997) 내로 형질전환시키고, 대규모 λ Int-조정된 제조합 및 미니백터(상표명) DNA 단리를 설명된 바와 같이 수행하였다(Fogg et al. 2006; Zhao et al. 2010). 닉킹된 DNA 백터를 발생시키기 위해서, 닉킹(nicking) 엔도뉴클레아제 Nt.BbvCI를 제조자 프로토콜에 따라 사용하였다. 선형화는 제조자 프로토콜에 따라 PvuI, BspHI, 또는 SeaI로 수행하였다.

[0079] DNA 전단

[0080] 분무를 위해, TE(10 mM 트리스-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) 중의 $1 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$ 에서의 DNA $10 \mu\text{l}$ 를 Aerotech II 젯트 분무기에 첨가하였다. 공기를 Aridyne 2000 압축기로 10 L/min의 속도 및 50 p.s.i.의 게이지 압력에서 분무기로 전달하였다. 분무 동안, 3 분 동안 0.5~3.5 분, 7~10 분, 20~23 분 및 25~28 분에서 모든 유리 임핀저(AGI)를 사용하여 에어로졸을 포획하고, AGI 저장소는 $20 \mu\text{l}$ TE를 수용하였다. 에어로졸 배출량은 대략 $0.3 \mu\text{lmin}^{-1}$ 이었다. 동시에, 분무기 저장소로부터 샘플 $15 \mu\text{l}$ 를 취했다.

[0081] 분무 생존에 대한 DNA 길이의 효과의 남은 연구를 위해, 분무 전과 DNA 용액이 고갈되는 때인 30 분까지의 분무에 걸쳐 간격으로 분무기 저장소로부터 분취량 $15 \mu\text{l}$ 를 제거하였다. 초기에 발생하는 가파른 변화로 인해, 초기에 1 분 또는 2 분 간격으로 분취량을 취했다.

[0082] 초음파처리를 위해, 에펜도르프 관 내에서 TE 중의 $1 \text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$ 에서의 DNA $1 \mu\text{l}$ 를 초음파처리 동안 얼음에서 7 와트(Root Mean Square)의 전력 배출에 해당하는 "5"로 설정된 1/8" 프로브 초음파분산기로 항온처리하였다. 초음파처리 전과 데이터에 제시된 시점에서의 초음파처리 동안 분취량 $15 \mu\text{l}$ 를 제거하였다. 모든 DNA 전단 실험을 별도로 최소 3회 수행하였다. 40 mM 트리스-아세트이트 및 2 mM EDTA 중에서 $> 1,000 \text{ bp}$ 에 대해 1% 아가로스 겔 또는 DNA $< 1,000 \text{ bp}$ 에 대해 5% 아크릴아마이드(29:1 아크릴아마이드:비스-아크릴아마이드) 겔에서 겔 전기영동으로 DNA를 분석하였다. 모든 겔을 2 시간 동안 125 볼트로 처리하고, 20 분 동안 SYBR® Gold(Invitrogen(미국 캘리포니아주 헤라클레스))로 염색하고 PC Image를 사용하여 가시화하였다. 남은 DNA를 정량하기 위해 Total Lab을 사용하였다.

[0083] 결과

[0084] 전단 저항에 대한 DNA 길이의 효과

[0085] 좁은 게이지 바늘침을 통한 통과, HPLC 펌프를 통한 순환, 분무 및 초음파처리를 비롯하여 수력학적 전단을 생성시키기 위한 여러 공정이 존재하고; 이러한 방법을 서열분석 또는 샷건 클로닝을 위해 DNA 단편을 생성하기 위해 통상적으로 사용한다(Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2006). 이의 재현 가능성 및 임상 관련성에 대해 처음에 분무를 선택하였다. DNA 백터가 분무로부터의 전단력을 견디는 경우, 초음파처리가 재현 가능성을 유지하면서 분무기보다 훨씬 더 큰 전단력을 이보다 더 긴 시간 동안 생성시키므로 이것을 이용하였다. 상이한 DNA 사이의 비교를 촉진하기 위해, DNA의 절반을 분해하는 데 필요한 시간을 나타내기 위해 생존₅₀이란 용어를 사용하였다. 괄호 내의 (Neb) 및 (Son)이란 용어는 각각 분무 및 초음파처리를 의미

한다. 하기 기재된 바대로 얻은 각각의 DNA에 대한 생존₅₀ 값은 또한 표 1에 기재되어 있다.

- [0086] DNA 샘플을 콜리슨(Collision)형 젯트 분무기에서 분무하였다(May K.R. (1973) The Collision Nebulizer. Description, Performance & Application J. of Aerosol Science, Vol. 4, #3, p. 235). 분무기는 다음과 같이 작동하였다: 고압 공기를 노즐 내 작은 구멍을 통해 펌프질하였다. 노즐과 저장소 사이의 압력차는 사이펀으로 치료 용액을 저장소로부터 고속 젯트 스트림으로 옮겨 크기가 15 내지 500 μl 인 1차 액적을 생성시켰다(Lentz et al. 2005, Aerosol Science 36, 973-990). 이 1차 액적 형성 동안 최소 DNA 분해가 발생하였다(Lentz et al. 2005, Aerosol Science 36, 973-990); 그러나, 액적은 폐로 깊게 침투하기에는 너무 컸다(Eberl et al. 2001, Eur J Nucl Med. 2001 Sep;28(9): 1365-72). 배플 내 플라스틱 콘은 1차 액적을 폐로 깊게 침투할 수 있는 더 작은(1-10 μl) 액적으로 부수었다(Bennet et al. 2002, Journal of Aerosol Medicine, 15, 179-188). 배플 내 플라스틱 콘에 의한 충격 동안 DNA 전단이 거의 배타적으로 발생한다(Lentz et al. 2005, Aerosol Science 36, 973-990). 배플 영역을 벗어난 더 작은 액적이 에어로졸 형태로 분무기를 빠져나왔다. 제거 가능한 뚜껑은 저장소로부터 샘플링을 허용하였다.
- [0087] 오직 적은 분율의 작은 액적을 공기 흐름으로 흡입구에서 수행하였고; 대부분의 액적이 저장소로 다시 응축하고, 여기서 이것은 노즐을 통해 재순환하였다. 결과로서, 저장소 내 DNA는 시간이 지남에 따라 점점 더 전단되었다.
- [0088] 응축 및 에어로졸화의 신속성으로 인해, 저장소 내 DNA의 상태는 에어로졸에서의 상태와 유사하였다(Knight et al, 1988, J of Infect Diseases, 158(2):443-8). 에어로졸을 포획하는 것보다 저장소로부터 샘플을 수집하는 것이 더 쉽고 덜 복잡해서, 에어로졸 및 저장소로부터 얻은 샘플을 비교하였다(데이터 미도시). 실제로, DNA 분해는 3,869 bp 플라스미드 또는 385 bp 미니백터인 이 연구에서 시험된 길이 스펙트럼의 말단 둘 다를 나타내는 DNA에 대한 자리 둘 다로부터 동일하였다. 남은 분무 실험에서, 따라서, 샘플을 저장소로부터 인출하였다.
- [0089] 281 내지 5,302 bp인 초나선형 DNA를 분무 처리하고 이의 생존율을 겔 전기영동으로 정량하였다. 시간이 지남에 따라 전장(순수한) DNA 백터의 소실로부터 DNA 전단 정도를 결정하였다. 결과는 매우 재현 가능하였고 농도에 무관하였다. 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 내지 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 범위의 DNA 농도가 1,873 bp의 DNA에 대해 동일한 결과를 발생시켰다(데이터 미도시). DNA 길이와 전단 사이의 관계식은 매우 비례하였다. 또한, DNA는 길이에 따라 다르게 분해되었다(도 8A 내지 도 8B). 2,600 bp 초과인 초나선형 DNA는 신속히 단편화되었고 유사 지수 분해를 나타냈다. 도 8A 내지 도 8B에서 S자형 곡선으로 볼 수 있는 것처럼 1,580 bp와 2,232 bp 사이의 초나선형 DNA 백터는 초기 전단 저항을 나타냈고, 그 후 분해되었다. 1,243 bp 이하의 초나선형 미니백터 DNA는 측정할 수 있도록 분해되지 않았고, 수성 용매의 증발로 인해 시간에 따라 약간의 농축 효과를 나타냈다.
- [0090] 비교적 큰 Minivector™ DNA, pMV-CMV-Luc2(2,679 bp)가 유사한 크기의 플라스미드와 비교하여 분무기 내에서 비교적 짧은 생존 시간을 가져, 플라스미드와 Minivector™ DNA 사이의 전단 생존 시간의 차이가 서열의 차이(예를 들면, 복제 기점, 플라스미드에 대한 유전자 코딩 항생제 저항)로 인한 것이 아니라는 것을 나타낸다.
- [0091] 분무 동안의 농축 효과가 전단에 저항인 작은 약물로 이미 관찰되었다. 분무의 종료 무렵에 저장소 용적이 작을 때 이 농축 효과는 더 뚜렷해진다. 3,000 bp 초과인 DNA는 분무의 초기 동안에 완전히 전단되었다. 따라서, 농축 효과는 이 큰 DNA 백터의 전단을 정량하기에 무시할만했지만, 농축 효과는 1,243 bp 이하의 DNA에 대한 데이터 정량화에 대한 도전을 부여한다.
- [0092] 1,243~1,714 bp의 초나선 미니백터 DNA가 분무 후 매우 순수하더라도, 전단된 단편은 초나선형 밴드 앞에 있는 더 짧은 DNA 단편의 스미어로서 보였다(데이터 미도시). 플라스미드로부터의 이 단편 및 이 더 큰 미니백터의 통상적인 분해 길이는 200~1,000 bp이었다.
- [0093] 분무기 내 385 bp 미니백터의 검출 가능한 전단이 없으므로, 초음파처리에 의해 생성된 전단력에 대한 이 미니백터의 저항을 시험하였다; 그 후, 1,243 bp 미만의 DNA 백터에 대한 생존₅₀(Son)을 측정하였다. 385 bp 백터의 생존₅₀(Son)은 28 분이었다. 비교하면, 동일한 조건 하의 초음파처리 동안 3,869 bp 플라스미드의 생존₅₀(Son)은 겨우 0.37 분이어서, 종래 플라스미드 백터에 비해 미니백터의 훨씬 더 높은 전단 저항을 나타낸다.
- [0094] 전단력에 대한 저항에 대한 DNA 토폴로지의 효과
- [0095] 385 bp mv-H1-CCR5shRNA Minivector™ DNA 및 1,873 bp pQR499 플라스미드의 선형, 닉킹 및 이완 형태를 생성

시켜 전단력에 대한 저항에 대한 DNA 토폴로지의 효과를 조사하였다. DNA의 이 토폴로지 형태는 (1,873 bp의 경우) 분무 또는(385 bp의 경우) 초음파처리되었고 이의 생존율을 시간에 따라 정량하였다(도 9). 예상된 바대로, DNA 초나선은 전단력 생존에 강한 보호 효과를 가졌다. 선형 형태의 1,873 bp DNA에 대한 생존₅₀(Neb)은 음성의 초나선 형태에서의 약 22 분과 비교하여 약 4 분이었다. 따라서, 초나선 매개 압축의 이익 없이, 선형 DNA는 아마도 훨씬 더 높은 수력학적 직경을 갖고; 선형 1,873 bp DNA는 훨씬 더 큰(3,000 bp 초과) 초나선 DNA 플라스미드와 유사하게 전단되었다. Nicking된(개방 원형) DNA는 선형보다 약 4 배 더 길게 지속되어, 어떻게 원형이 수력학적 직경을 감소시키는지를 반영한다. 이미 존재하던 Nick DNA 벡터 생존율을 감소시킨다는 것을 예상할 수 있다. (가닥 둘 다 공유 폐쇄된) 이완 1,873 bp는 Nicking된 1,873 bp 플라스미드와 동일하게 생존하였다. 따라서, Nick은 추가로 DNA를 전단력으로 가지지 않았다. Nicking형, 이완형 또는 초나선형 DNA가 분무에 의해 전단되므로, 본 발명자들은 전장 선형 형태에 해당하는 어떠한 분해 생성물도 관찰하지 못했다. 전장 선형 형태가 신속히 전단되고 이에 따라 축적되지 않자, 이는 대부분 아마도 선형 DNA의 짧은 수명의 결과의 결과이다. 음성의 초나선은 Nicking 및 이완 1,873 bp DNA에 비해 재현 가능한 전단 생존율의 증가(약 1.3 배)를 제공하였다.

[0096] 385 bp 미니벡터에 대해 DNA 토폴로지에 대한 유사한 의존성이 관찰되었다. 선형 385 bp DNA는 초음파처리 동안 신속히 분해되었다. Nicking된 385 bp DNA는 선형보다 약 7 배 길게 생존하였다. 초나선 385 bp Minivector™ DNA는 Nicking된 385 bp DNA보다 약 4 배 더 길었고, 이것은 초나선 1,873 bp DNA에 대해 관찰된 것보다 더 가파른 개선이었다.

[0097] 토의

[0098] 2,000 bp 미만의 Minivector™ DNA는 분무기 내에서 현저히 분해되지 않았다. Minivector™ DNA의 전단력에 대한 저항은 대부분 이의 작은 크기에 기인하는 것으로 보였다. 플라스미드 크기가 3,000 bp 미만으로 떨어지면서 분무기 내 생존 시간은 크게 증가하였다(도 9).

[0099] 전단력으로부터 DNA를 보호하기 위한 효과

[0100] 전달 동안 취약한 종래 플라스미드 DNA 벡터 또는 siRNA를 보호하기 위한 비히클 시스템의 조성물을 개선하는데 있어서 많은 노력이 이루어졌고 지속하였다. 폴리에틸렌이민(PEI)과 같은 양이온체는 DNA를 응축시키고, 수력학적 직경을 감소시키고, 이에 의해 전단으로부터 DNA를 보호하는 것을 돕는다(Belur et al. 2007, Nat Protoc 2: 146-52; Lentz et al. 2005, Aerosol Science 36, 973-990). 대부분의 이 비히클은 불행하게도 세포 독성이어서(Brunot et al. 2007, Biomaterials 28:632-40; Moghimi et al. 2005, Molecular therapy 11: 990-5), 이의 이용을 제한한다. PEI는 혈액으로 전달될 때 세포독성이지만, 전신 투여와 비교하여 에어로졸로 전달될 때 덜 독성이다(Di Giola and Conese, 2009, Drug Des Devel Ther. 2009 Feb 6;2: 163-88). 심지어 축합제의 부재 하에도 전달과 관련된 전단력에 저항하는 Minivector™ DNA의 능력은 독성 비히클에 대한 필요성을 감소시켜야 한다. 몇몇 비히클은 DNA가 폐 내 세포로 진입하기 위해 아마도 여전히 필요하지만, 이것은 종래 플라스미드 DNA 벡터에 대해 필요한 것보다 덜 필요해야 한다.

[0101] DNA 전단의 유전자 치료에 대한 치료 결과

[0102] DNA 전단의 명확한 손상은 치료에 남은 순수한, 생물학적 활성 벡터의 양의 감소이다. 이것은 전달되는 DNA의 양이 초나선 벡터의 손실을 보상하도록 간단히 증가된다는 것이 논쟁된다. 이렇게 하는 것은 2가지 부정적인 결과를 갖는다. 첫째, 벡터의 증가량은 세포독성 전달 비히클의 양의 적절한 증가를 요한다. 둘째로, 많은 플라스미드 DNA가 더 짧은 선형 DNA 단편으로 파괴된다. 벡터 관련 독성은 짧은 선형 DNA 단편의 전달로부터 발생할 수 있다. 전단 DNA의 전달의 추가의 결과는 DNA 분해 및 DNA 보수 및 재조합 경로의 유도를 들 수 있고, 이는 가능하게는 게놈 불안정성을 발생시켰다. 유리 DNA 말단은 신속히 세포 내에서 처리되었다. 한 극단의 경우, DNA 말단은 특히 다량으로 전달되는 경우 세포사멸을 촉발하였다. 다른 극단의 경우, 세포는 무작위 방식으로 DNA를 보수하고 결합하여 큰 에피솜 연속동일순서를 형성하였다. 이것은 마우스 간으로 전달된 선형 DNA에 대해 보고되었고, 이런 경우 수주 지속하는 안정한 장기간 전이유전자 발현을 생성시킨다(Chen et al, 2001, Molecular Therapy, 3, 403-410). DNA 전단으로부터 생긴 무작위 DNA 단편이 함께 결합하여 새로운 독성 유전자 생성물에 대한 가능성으로 새로운 서열을 생성시킬 수 있다.

- [0103] 따라서, Minivector™ DNA가 단순히 분무 동안 종래 플라스미드 벡터보다 더 오래 분무 및 초음파처리에 생존하지 않지만, 임의의 DNA 분해의 경우 매우 적게 순수하게 생존한다는 것이 중요하다. 따라서, 짧은 선형 DNA 단편을 전달하는 위험은 더 작은 초나선 DNA 벡터를 사용함으로써 상당히 감소하였다.
- [0104] *DNA 전달에 대한 모델*
- [0105] DNA 초나선은 전달 생존에 상반되는 효과를 가질 수 있다. 초나선 DNA에서의 비틀림 응력은 분자가 전달에 더 민감하게 하지만, 압축은 전달 저항을 증가시킨다(Lengsfeld and Anchordoquy, 2002, Journal of Pharmaceutical Sciences, 91, 1581-1589). 본원에서의 데이터는 압축의 유리한 효과는 주요한 효과라는 것을 보여준다. 초나선에 의해 제공된 이점은 DNA가 더 커지면서 감소하였다.
- [0106] *폐로의 DNA 벡터 전달*
- [0107] 전달력에 생존하는 DNA 벡터 길이를 확인하는 것은 어떠한 전달 경로이든지 간에 유전자 치료 전달에 대한 중요한 영향을 갖는다; 그러나, 콜리슨형 젯트 분무기의 사용은 본 발명의 데이터가 폐로의 치료학적 전달에 특히 관련되게 만든다. 폐는 정맥내, 기관내, 비강내 및 에어로졸 전달 방법에 의해 용이하게 접근 가능하고, 이 경로 중 임의의 경로는 DNA 벡터 전달에 알맞다. 그러나, 에어로졸에 의한 핵산의 전달은 비침습적이고, 이환 조직에 직접 전달하여, 비표적 기관에서 합병증을 예방하는 것을 도울 수 있다. 추가로, 에어로졸 전달은 전신 투여에 의해 얻을 수 있는 것보다 훨씬 더 많은 양으로 DNA가 폐로 전달되게 한다(Bennet et al. 2002, Journal of Aerosol Medicine, 15, 179-188). 폐 질환 치료에 여러 유망한 유전자 치료 표적이 확인되었다. 표적 낭포성 섬유증 치료를 표적하는 수십가지 유전자 치료 임상 실험이 진행중이다; 그러나, 실망스럽게도, 그 치료는 아직까지 성공적이지 않다(O' Sullivan and Freedman, 2009, Lancet, 373, 1891-1904). 천식은 또한 RNA 간섭(Duncan et al, 2008, Molecular Pharmaceutics, 5, 559-566) shRNA(Kozma et al, 2006, J. Immunol 176: 819-26) 또는 마이크로RNA(miRNA)에 대한 질환 표적으로서 높은 가능성을 갖는다.
- [0108] **실시예 6: 초나선형 미니벡터에 대한 화학 부분(moieties)의 부착**
- [0109] 처음에 초나선 미니벡터 DNA를 닉킹 엔도뉴클레아제, Nt. BbvCI로 닉킹하여 단일 가닥 원형 DNA 주형을 생성하였다. 그 후, T7 엑소뉴클레아제는 닉킹된 가닥이 완전히 분해될 때까지 닉에서 뉴클레오티드 제거를 개시할 수 있었다. 순수한 가닥은 엑소뉴클레아제가 작용하는 5' 말단이 부족하고, 이에 따라 비분해로 머물렀다. 그 후, 내부 표지된 5'-인산화 올리고뉴클레오티드 프라이머는 원형 ssDNA 주형에 어닐링하였다. 그 후, T4 DNA 폴리머라제를 사용하고, 프라이머에서 시작하고 종료하여, 닉킹된 원형 표지된 DNA를 생성시켜 제2 가닥을 재합성하였다. 초나선을 회복하기 위해, DNA 나선을 부분적으로 권출시키는 인터칼레이터인 브롬화에티듐(EtBr)을 첨가하였다. T4 DNA 리가제에 의한 닉의 실링은 권출부를 가두었다. 부탄올 추출에 의한 EtBr의 후속 제거는 음성으로 초나선화된, 표지된 미니벡터 DNA를 생성시켰다. 공정 흐름도를 도 10에 나타냈다.
- [0110] 절차의 다양한 단계에서의 생성물을 5% 폴리아크릴아마이드 겔에서 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동으로 분석하였다. DNA를 SYBR Gold로 염색함으로써 가시화하거나, Typhoon Imager(GE Life Sciences)를 사용하여 532 nm 레이저로 여기시켜 형광 Cy3 라벨의 존재를 검출함으로써 가시화하였다. Cy3 형광은 표지된 프라이머의 어닐링 및 제2 가닥의 재합성 이후 절차의 마지막 단계에서 오직 검출되었다.
- [0111] Cy3 표지된, 339 bp 미니벡터 DNA를, 완전한 미니벡터와 관련되지 않는 표지 프라이머를 제거하기 위해 5 OK MW 컷오프 배제 필터 칼럼을 통해 정제한 후 리포솜 형질감염 시약 "Lipofectamine 2000"을 통해 HeLa 세포로 형질감염시켰다. 형광 라벨이 없는 동일한 339 bp 미니벡터를 음성 대조군으로서 병렬 실험에서 HeLa로 형질감염시켰다. 형질감염 3 시간 후 이미지는 457 nm에서의 청색 발광 채널을 통해 확인된 DAPI 염색 핵을 나타냈다. Cy3 표지된 DNA가 617 nm에서의 근적색 채널을 통해 확인되었다. 이미지는 Cy3 표지된 DNA의 존재 및 형광 영상화 방법을 통해 미니벡터 DNA를 가시화하는 능력을 확인시켜 주었다(데이터 미도시).

- [0112] 참조문헌
1. Taroncher-Oldenburg G, Marshall A. Trends in biotech literature 2006. *Nature biotechnology* 2007; **25**(9): 961.
 2. Kurreck J. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angewandte Chemie (International ed)* 2009; **48**(8): 1378-98.
- [0113]
3. Kim B, Tang Q, Biswas PS, Xu J, Schiffelers RM, Xie FY *et al.* Inhibition of ocular angiogenesis by siRNA targeting vascular endothelial growth factor pathway genes: therapeutic strategy for herpetic stromal keratitis. *The American journal of pathology* 2004; **165**(6): 2177-85.
 4. Haussecker D, Cao D, Huang Y, Parameswaran P, Fire AZ, Kay MA. Capped small RNAs and MOV10 in human hepatitis delta virus replication. *Nature structural & molecular biology* 2008; **15**(7): 714-21.
- [0114]
5. Shi Y. Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet* 2003; **19**(1): 9-12.
 6. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science (New York, N.Y)* 2002; **296**(5567): 550-3.
- [0115]
7. Ma HT, On KF, Tsang YH, Poon RY. An inducible system for expression and validation of the specificity of short hairpin RNA in mammalian cells. *Nucleic acids research* 2007; **35**(4): e22.
 8. Darquet AM, Cameron B, Wils P, Scherman D, Crouzet J. A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle. *Gene therapy* 1997; **4**(12): 1341-9.
- [0116]
9. Yew NS, Zhao H, Przybylska M, Wu IH, Tousignant JD, Scheule RK *et al.* CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression in vivo. *Mol Ther* 2002; **5**(6): 731-8.
 10. Reyes-Sandoval A, Ertl HC. CpG methylation of a plasmid vector results in extended transgene product expression by circumventing induction of immune responses. *Mol Ther* 2004; **9**(2): 249-61.
- [0117]
11. Ritter U, Damm-Welk C, Fuchs U, Bohle RM, Borkhardt A, Woessmann W. Design and evaluation of chemically synthesized siRNA targeting the NPM-ALK fusion site in anaplastic large cell lymphoma (ALCL). *Oligonucleotides* 2003; **13**(5): 365-73.
 12. Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, Verma IM. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; **100**(4): 1844-8.
- [0118]

13. Fogg JM, Kolmakova N, Rees I, Magonov S, Hansma H, Perona JJ *et al.*
Exploring writhes in supercoiled minicircle DNA. *J Phys Condens Matter*
2006; **18**(14): S145-S159.
14. Chen et al. (2004). *Gene Therapy* vol. 11, 856-864.
15. Li et al. 2006 *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 103, 17337-17342.

[0119]

[0120]

[0121]

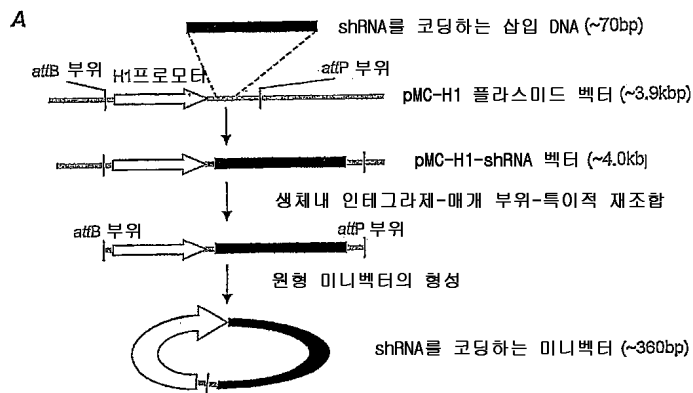
본원에 인용된 모든 특허, 공개 출원 및 참조문헌의 교시는 전적으로 원용된다.

본 발명이 특허 이의 실시예 실시양태를 참조하여 도시되어 있고 설명되어 있지만, 특허청구범위에 의해 포함된 본 발명의 범위로부터 벗어남이 없이 본원에서 형태 및 상세내용에 있어서의 다양한 변형이 이루어질 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

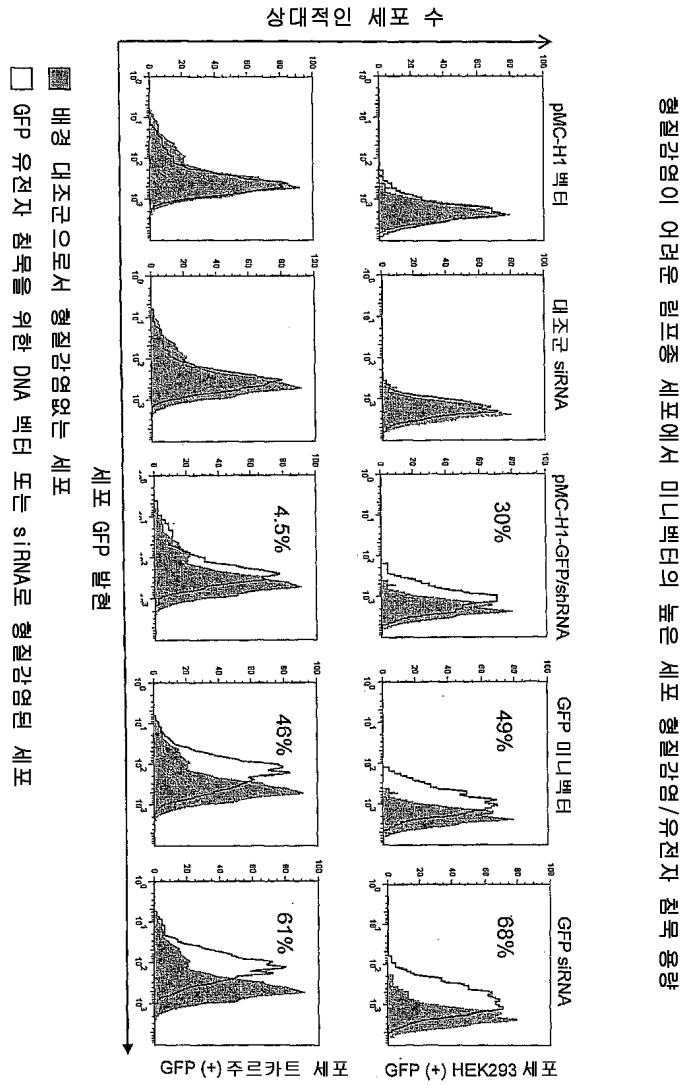
도면

도면1

유전자 침묵을 위한 shRNA를 코딩하는 미니백터의 제조

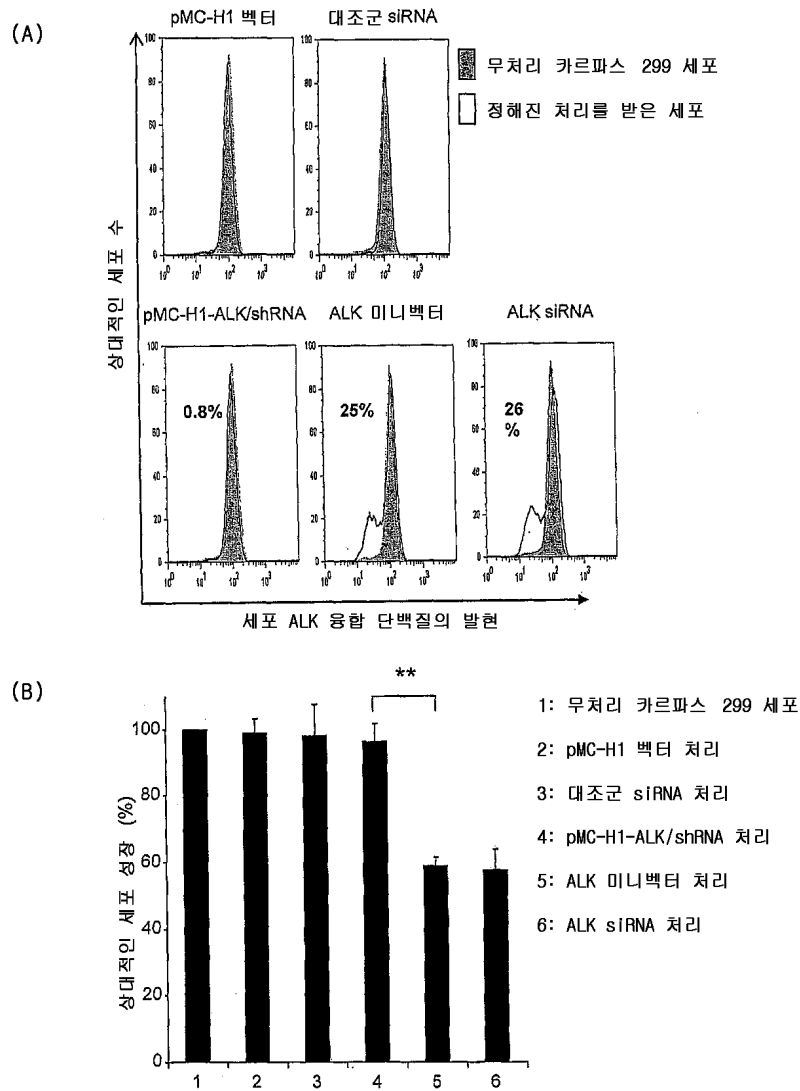


도면2

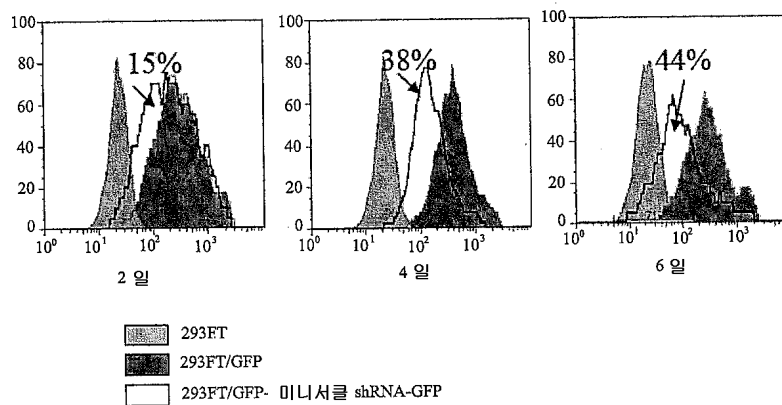


도면3

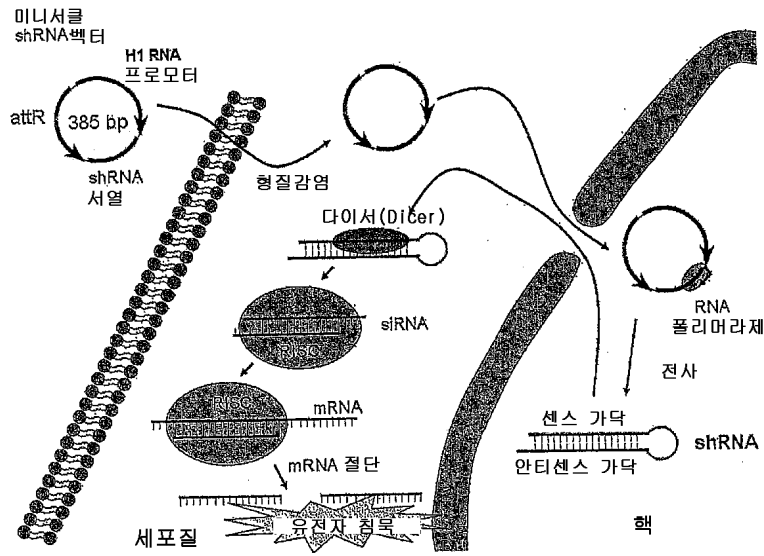
미니벡터-유도된 ALK 유전자 침묵 및 ALCL 세포의 성장 억제



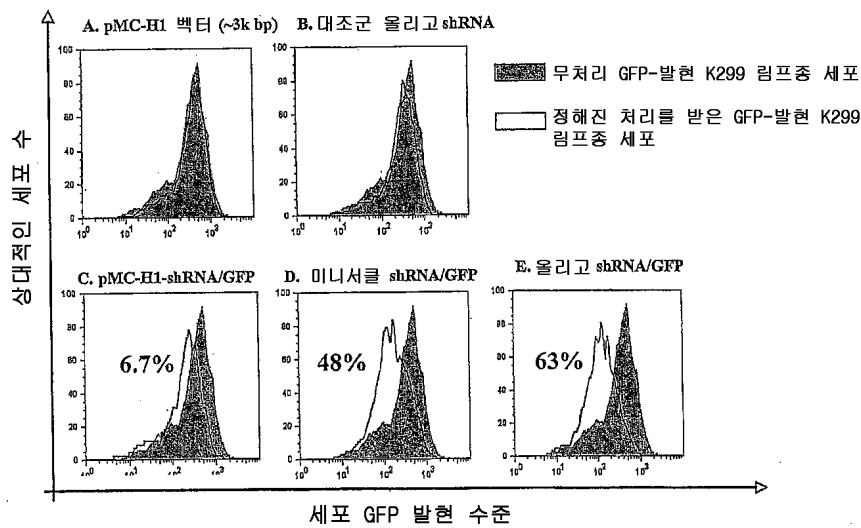
도면4



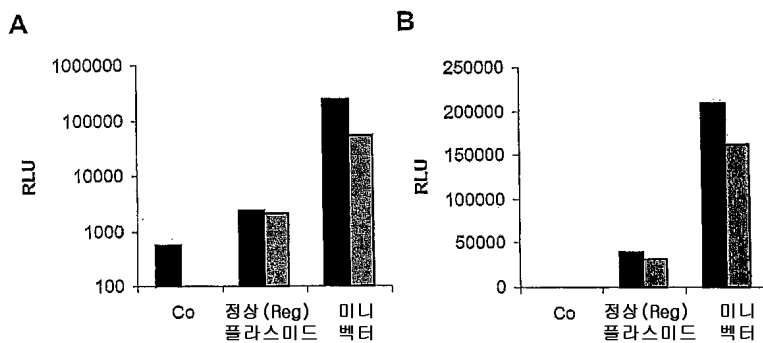
도면5



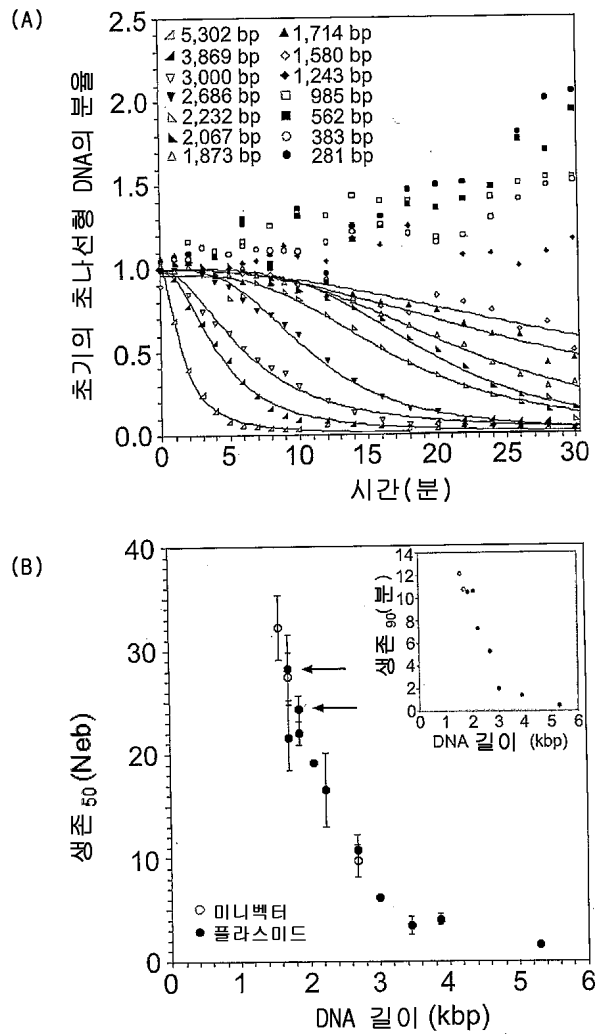
도면6



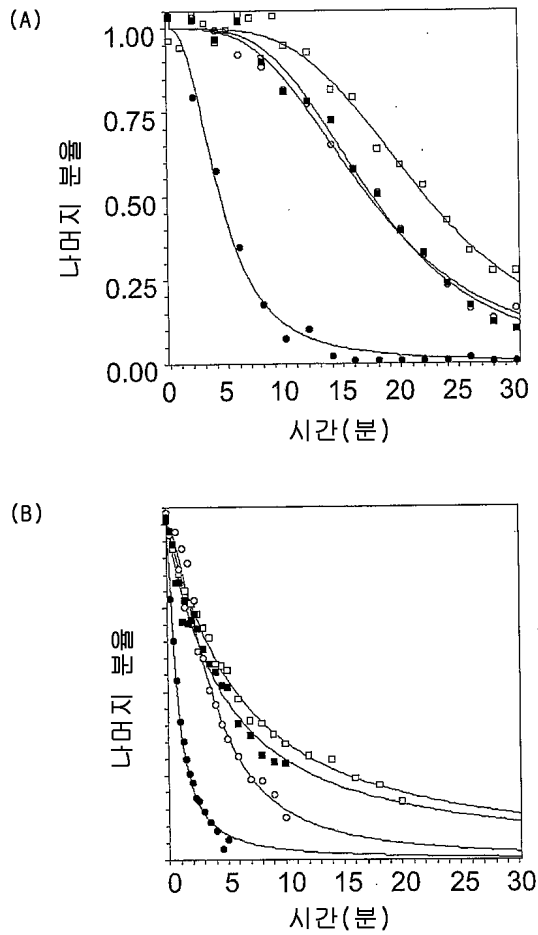
도면7



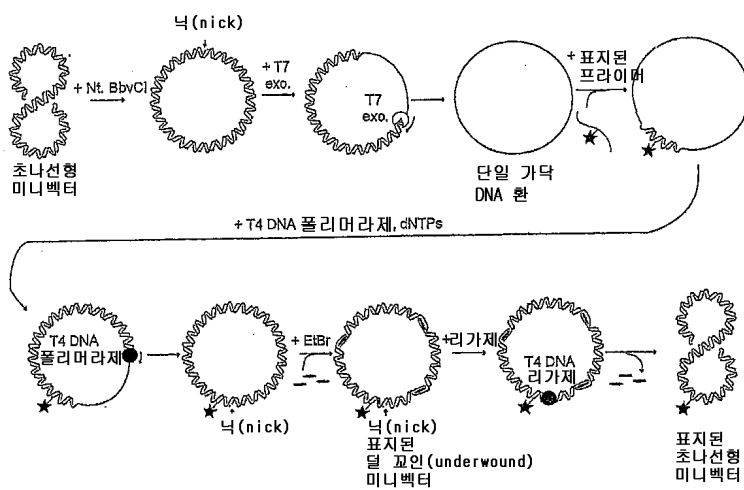
도면8



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Baylor College of Medicine

E. Lynn Zechiedrich
Jonathan Fogg
Daniel James Catanese
Erol Bakkalbasi
Brian E. Gilbert

<120> Supercoiled Minicircle DNA for Gene
Therapy Applications

<130> 3907.1005-002

<140> PCT/US2010/052920

<141> 2010-10-15

<150> 61/252,455

<151> 2009-10-16

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 1

cacuuaguag uguaccgcct t 21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 2

ggcgguacac uacuaagugt t 21

<210> 3

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 3

gatccccgca agctgaccct gaagttcttc aagagagaac ttcaggggtca gcttgctttt 60

ta 62

<210>

4

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

gatccccgag ttggtcattg cgaggatgcc atttcaagag aatggatatcc tcgtaatgac 60

cagctctttt ta 72