



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년03월04일
(11) 등록번호 10-0809312
(24) 등록일자 2008년02월26일

(51) Int. Cl.

C12N 15/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2002-7007394
(22) 출원일자 2002년06월10일
심사청구일자 2005년12월09일
번역문제출일자 2002년06월10일
(65) 공개번호 10-2002-0063588
(43) 공개일자 2002년08월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2000/033645
국제출원일자 2000년12월11일
(87) 국제공개번호 WO 2001/42449
국제공개일자 2001년06월14일

(30) 우선권주장

60/170,166 1999년12월10일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

EP0633315 A2

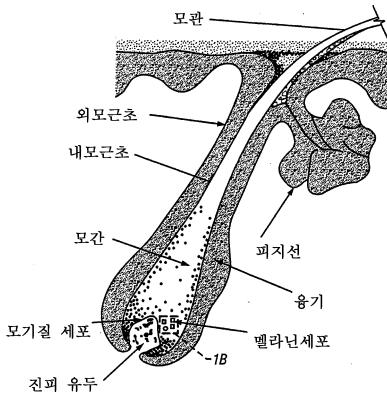
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 조경주

(54) 포유동물 피험체속에 유전자를 도입하는 방법**(57) 요 약**

조직배양물중에서 세포의 유전자 변형을 수행하는 방법이 기술되어 있다. 당해 변형은, 조직배양물을 목적하는 유전자를 위한 전달 비히클과 접촉하기 전에 조직배양물을 콜라겐아제로 처리함으로써, 촉진된다. 모낭 및 다른 조직화된 조직을 이러한 방법으로 변형시킨 후, 온전한 수용체속에 이식할 수 있다.

대표도 - 도1A

(56) 선 행 기술 조사 문현

US05266480 A1

US05641508 A1

US05672508 A1

WO1996023508 A1

WO1997020924 A1

WO1998022589 A2

(81) 지정국

국내 특허 : 오스트레일리아, 캐나다, 일본, 대한민국

EP 유럽 특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀란드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 터키

특허청구의 범위

청구항 1

조직배양된 조직 시료를, 콜라겐아제의 농도, 항온처리의 온도 및 항온처리의 시간을 조절함으로써 조직이 핵산 분자를 받아들이는 능력은 증가되나 조직배양물의 온전한 상태는 파괴되지 않도록 콜라겐아제로 처리하는 단계, 및

상기 처리된 조직을 핵산 분자와 접촉시키는 단계를 포함하여, 조직을 형질감염시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 조직 시료가 진피, 럼프 조직 또는 하나 이상의 모낭인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 접촉 단계가 바이러스성 백터의 형태로 또는 리포팩션을 이용하여 조직을 형질도입시킴으로써 핵산 분자를 제공함을 포함하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 바이러스성 백터가 바이러스 패키징 세포의 상청액, 레트로바이러스 백터 및 아데노바이러스 백터에서 하나 이상 선택된 백터를 포함하는 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

명세서

기술 분야

<1>

본 발명은 이종 유전자를 함유하도록 포유동물 피험체를 변형시키는 방법에 관한 것이다. 보다 상세히, 본 발명은 모낭을 포함하여 조직배양된 조직을 생체외에서 처리하고, 조직 또는 모낭을 수용체에 재이식하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2>

사람을 포함하여 포유동물 피험체의 유전자 상보체의 체세포 변형을 다양한 기법을 사용하여 시도하였다. 예를 들면, 목적하는 유전자를 포함하는 아데노바이러스 벡터를 사용하여 원위치에서(*in situ*) 바로 온전한 조직 및 기관을 감염시킬 수 있다. 보다 전형적으로, 아마도 세포 배양물 또는 세포 상청액을 생체외에서 변형시킨 다음, 혈류를 통해 온전한 피험체에 다시 도입한다. 예를 들면, 마우스 티로시나제 유전자중의 알비노(albino) 점 돌연변이를 교정하기 위하여 고안된 RNA-DNA 올리고뉴클레오티드(RDO)는 배양된 알비노 개체의 멜라닌세포에서 이러한 상태를 교정할 수 있었다[참조 문헌: Alexeed, D., et al., Nature Biotechnol(1998) 16:1343-1346]. 이러한 연구는 동일한 그룹에 의해 보고된 바와 같이 확대되어, 리포좀중의 RDO를 전달하거나 피내 주사에 의해 동일한 결함을 생체내에서 교정하게 되었다[참조 문헌: Alexeed, D., et al., Nature Biotechnol(1999) 16:1343-1346]. 초기 연구는 리포좀-포획된 lacZ을 사용한 모낭의 선택적 유전자 치료를 기술하고 있다[참조 문헌: Li, L. et al., Nature Med(1995) 1:705-706]. 리포좀 조성물의 바람직한 수용체는 성장기의 내인성 모낭이었다[참조 문헌: Domashenko, A. et al., J. Invest Dermatol (1999) 112:552].

<3>

따라서, 배양물중에서 모낭 세포를 개별적으로 변형시키고 생체내에서 온전한 모낭을 변형시킬 수 있었다. 또한, 판상 어린선을 앓는 환자로 부터 유래된 돌연변이형 피부 각질세포를 배양하고 시험관내에서 유전자조작하여 안전하게 변형시킨 다음, 누드 마우스에 이식하여 정상 상피를 수득할 수 있다는 것이 밝혀졌다[참조 문헌: Choate, K.A. et al., Nature Med(1996) 2:1263-1267]. 유사하게, 시험관내에서 개별적으로 배양된 각질세포를 유전자조작으로 변형시킨 후, 누드 마우스에 이식하여 재-형성된 조직을 수득할 수 있다[참조 문헌: Deng, H., et al., Nature Biotechnol(1997)15:1388-1391]. 또한, 상이한 개체의 두피로 부터 채취된 모낭 진피 초(sheath) 세포로 부터 모낭이 형성될 것이라는 것이 밝혀졌다[참조 문헌: Reynolds, J., et al., Nature

(1999) 402:33-34].

<4> 간략히 말하면, 개개의 세포를 유전자조작으로 변형시킨 후 온전한 생물체에 이식할 수 있으며, 이식되어진 개 개의 세포는 적당한 조건하에서 구조화된 조직을 형성할 수 있다는 것이 밝혀졌다.

<5> 일반적으로 유전자 또는 DNA를 사람 피부에 직접 적용하는 것이, 적어도 암호화된 항원에 관한 면역화 측면에서 효과적이라는 것이 밝혀졌다. 이는 다수의 문헌[Tang, D-C, et al., Nature(1997) 388:729-730; Yu, W-H, et al., J.Invest Dermatol (1999)112:370-375; Falo, L.D.Jr., Proc Assoc Am Physicians(1989) 111:211-219; Shi, Z., et al., Vaccine(1999) 17:2136-2141; and Tuting, P., et al., J.Invest Dermatol(1998) 111:183-188]에 보고되어 있다. 문헌[Fan, H. et al., Nature Biotechnol(1999) 17:870-872]에는, B형 간염 표면 항원에 대한 반응을 유도하는데는, 상기 항원을 암호화하는 유전자를 모낭-함유 정상 피부에 적용할 때, 효과적이라는 것을 추가로 밝혔다. 그러나, 모낭이 결핍된 피부는 예방접종을 위한 표적으로서 적합하지 않다.

발명의 개시

<6> 본 발명은, 모낭을 지닌 조직을 포함하여 조직배양된 조직을 생체외에서 유전자조작하여 성공적으로 변형시킨 다음, 온전한 포유동물 피험체속에 성공적으로 이식시킬 수 있다는 발견을 토대로 한다. 이러한 변형의 성공은, 유전자 변형 전에 조직배양된 조직을 콜라겐아제로 처리함으로써 증가된다.

<8> 따라서, 일면에서, 본 발명은, 임의로 조직을 콜라겐아제로 처리한 다음, 당해 조직의 조직배양물을 핵산으로 처리하는 단계를 포함하여, 핵산을 조직에 전달하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 조직은 모낭을 지닌 조직이다.

<9> 또 다른 면에서, 본 발명은, 생체외에서 핵산 분자를 함유하도록 변형된 하나 이상의 모낭을 포유동물 피험체의 진피속에 이식하거나, 생체외에서 핵산 분자를 함유하도록 변형된 조직배양된 조직을 포유동물 피험체의 상응하는 조직속에 이식하는 단계를 포함하여, 핵산 분자를 포유동물 피험체속에 도입하는 방법에 관한 것이다. 두 경우 모두에서, 목적하는 핵산으로 변형시키기 전에, 조직배양물을 콜라겐아제로 처리한다.

<10> 또 다른 면에서, 본 발명은 이종성 핵산을 함유하도록 변형된 조직배양된 조직에 관한 것이다.

발명의 상세한 설명

<14> 유전자 변형을 위한 기질로서 조직배양된 조직을 사용하는 것은 직접적으로 생체내 적용하는 것에 비해, 그리고 개별적으로 배양된 세포를 생체외에서 변형한 후 생체내 이식하는 것에 비해 여러가지 장점이 있다. 당해 조직은 3차원적 본래 상태를 유지하므로, 수용체에 이식된 경우, 보다 용이하게 재구성된다. 생체외에서 조직을 조작함으로써, 유전자 변형의 수준을 조절할 수 있으며, 피험체의 침습 처리 전에 성공을 가능할 수 있다. 비록 조직이 이종성 핵산을 수용할 수 있는 능력을 증가시키기 위하여 배양된 조직을 콜라겐아제로 처리하는 것이 유리하지만, 이러한 처리는 3차원적 배열의 본래 상태를 완전히 파괴할 정도로 심해서는 안된다.

<15> 3차원적 조직배양물은, 피부, 특히 모낭을 지닌 피부, 림프 조직, 또는 종양 조직을 포함하여 임의의 조직으로부터 집합될 수 있다. 조직의 선택은 고려되는 처리의 특성에 따라 결정될 것이다. 조직배양물은 온전한 단편으로서 제공되는 조직 샘플의 조직화를 유지한다. "온전한"이란, 이종성 핵산을 함유하도록 세포를 변형시키기 전 및 후에 조직의 3차원적 조직화를 조직배양물에서 보존하는 것을 의미한다. 아래에 기술한 바와 같이, 조직배양물을, 적당한 핵산-함유 벡터 또는 핵산 함유 제형물을 공급하기 전에 콜라겐아제로 처리할 수 있다. 그러나, 콜라겐아제에 의한 처리는 조직화의 필수 요소가 보존되도록 충분히 약해야 한다. 따라서, "온전한" 조직 또는 "온전한" 단편은, 본 발명의 방법에 따라 콜라겐아제로 처리하기 전 및 후에, 공여 피험체로 부터 수득된 바와 같은 조직의 단편을 의미한다.

<16> 예를 들면, 모낭은 모발의 성장 및 특성에 영향을 주기 위한 유전자의 수용체로서 유용할 뿐만 아니라, 면역원, 및 전체적으로 취하게 될 때 생물체에 유용한 기타 생성물을 생성할 수 있다. 따라서, 모낭의 형질전환은 전체 생물체에 대한 유전자 치료에서 중간 단계로서 쉽게 사용될 수 있다. 예를 들면, 요구된 항원을 생성하도록 모낭을 변형시킴으로써 수득된 면역화는, 모낭을 지닌 피부만이 DNA를 수용하여 항원에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 반면, 모낭이 없는 피부는 그러하지 못하다는, 위에서 보고된 관찰과 일치한다.

<17> 따라서, 모낭 또는 모낭을 지닌 피부가, 처리하여 시험관내에서 배양하고자 하는 피험체의 중요하지 않은 부위로 부터 제거될 것이다. 바람직하게는, 모낭을 지닌 피부가 조직배양될 것이다. 이어서, 조직배양된 피부를,

모낭이 이종성 핵산을 흡수할 수 있는 능력을 증가시키기에 충분한 시간 동안 소정량의 콜라겐아제로 처리한다. 그러나, 이러한 처리는 조직배양물이 붕괴되지 않도록 조절한다. 이어서, 배양물 또는 조직배양물중의 온전한 모낭을 적당한 벡터로 처리하여 목적하는 핵산을 전달한다. 이러한 벡터는 아데노바이러스 또는 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터, 또는 패키징 세포로 부터의 상청액을 포함한다.

- <18> 일반적으로, 일면에서 본 발명은 유전자 발현 벡터 또는 나출형 DNA를 위한 전달 시스템으로서의 모낭의 용도에 관한 것이다. 본 발명을 수행하기 위하여, 모낭을 채취하고 처리하기에 적당한 방법을 사용하여야 한다; 각종 수단을 이용하여 모낭을 변형시킬 수 있으며; 이어서, 모낭을 수용체에 재이식할 수 있다.
- <19> 모낭을 채취하기 위하여, 바람직하게는 모낭을 지닌 피부를 적당한 공여체로 부터 작은 조각으로 제거한다. 만일 모낭이 이미 성장기에 있는 경우, 이들을 직접 조직배양할 수 있다. 그러나, 공여체가 성장기에 있지 않은 모낭을 갖는 경우, 예를 들며 왁스 처리로 피부를 탈모시킨 다음, 얼마 후 성장기에 도달한 때 모낭을 지닌 피부 조각을 제거하는 방법으로 이들을 재동조화시킨다. 통상적으로, 이는 쥐 피험체의 경우에 3 내지 10일 후, 보다 바람직하게는 5 내지 7일 후, 가장 바람직하게는 6일 후이며; 다른 포유동물 피험체는 성장기를 재달성하는데 다양한 소요 기간을 나타낼 것이다. 최적 대기 시간이 쉽게 결정될 수 있다. 이어서, 성장기에 있는 모낭을 지닌 피부를, 통상 콜라겐을 기본으로 하는 3차원 매트릭스속에 매몰시킨다. 이어서, 조직배양물을 콜라겐아제, 또는 감염 또는 형질도입을 용이하게 하는 다른 적당한 용해 효소로 처리하면, 목적하는 이종성 유전자에 의한 후속적 변형이 증가된다는 것이 본 발명자들에 의해 밝혀졌다.
- <20> 콜라겐아제에 의한 처리는 후속적인 유전자 변형을 증가시키기에 충분하여야 하지만, 조직배양물의 본래 상태를 파괴할 정도로 심해서는 안된다. 콜라겐아제 분해의 정도는 콜라겐아제의 농도, 항온처리의 온도, 및 항온처리 시간을 제어함으로써 조절될 수 있다. 이들은 상호의존적인 요인이고 최적 수준은 실험에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 전형적인 적합한 조건은 1 내지 2시간 동안 37°C에서의 약 2mg/ml 콜라겐아제 용액이다.
- <21> 지지 매트릭스를 "느슨하게"한 후, 조직배양물은 유전자 변형을 수용하기에 적합한 상태가 된다. 이 단계에서 고려해야 할 요인은 변형 방법의 특성이다 - 즉, 사용된 벡터 시스템 또는 방법론 및 삽입되어질 유전자의 속성.
- <22> 통상적으로, 유전자 변형은 시판 시스템을 포함하여, 일반적인 리포좀계 시스템 또는 리포펙션(lipofection)으로 처리함으로써 달성된다. 아데노바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터, 및 일반적인 바이러스 벡터의 경우에 이러한 벡터에 대한 패키징 세포로 부터의 상청액이 사용된다. 적합한 조건하에서 나출형 DNA에 의한 형질도입도 또한 달성될 수 있다.
- <23> 도 1은 전형적인 모낭의 그림을 도시한다. 도시된 바와 같이, 모관이, 지질을 분비하는 피지선에 연결된다. 본원의 출원인에 의해 밝혀진 바에 따르면, 일반적인 조성물을 선택적으로 모낭에 전달하는 것은 리포좀 조성물을 사용함으로써 달성될 수 있다. 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제5,914,126호를 참조하라. 따라서, 임의로 콜라겐아제로 처리된 조직배양된 샘플에서, 모낭-특이적 효과를 위한 핵산을 선택적으로 모낭에 전달하는 것이 달성될 수 있다.
- <24> 본 발명의 또 다른 방법에서, 특히 핵산 분자의 일반적인 국소 전달 또는 전신 전달을 바란다면, 피험체의 진피 또는 다른 조직의 조직배양된 샘플을 사용할 수 있다. 이러한 경우에는 선택적 전달이 요구되지 않는다. 샘플을 조직배양하는데 일반적으로 적합한 방법은 익히 공지되어 있다; 예를 들면, 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 제5,849,579호 및 미국 특허 제5,726,009호에 기술된 것이 바람직하다.
- <25> 삽입될 유전자는 그 자신의 조절 서열에 작동가능하게 연결되어 제공될 수 있거나, 모낭 세포에 내인성인 co-opt 프로모터일 수 있는 나출형 DNA가 제공될 수 있다. 통상적으로 조절 서열은, 포유동물 세포와 화합성인 구성적(constitutive) 또는 유도성일 수 있는 프로모터를 포함한다. 이러한 프로모터로는, CMV 프로모터, HSV 프로모터, 아데노바이러스로 부터의 LTR, 및 메탈로티오닌 프로모터가 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <26> 적합한 뉴클레오티드 개방 판독 프레임으로는, 면역 반응을 유도하고, 모발 성장을 조절하고, 모발색을 변화시키는 단백질을 암호화하거나, 호르몬 또는 치료학적 화합물인 단백질을 암호화하는 것들이 포함된다. 뉴클레오티드 서열의 선택은 환경 또는 원하는 결과에 따라 결정된다. 따라서, 예를 들면 원하는 최종 결과가 수용체에게 특정한 모발 색 및 밀도 특징을 공급하는 것이라면, 멜라닌 생성에 관여하는 티로시나제와 같은 단백질을 암호화하는 개방 판독 프레임이 포함될 것이며, 또한 모발 성장을 자극하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 포함될 것이다. 이러한 경우에 적절한 방법은, 본 발명의 방법에 따라 변형된 모낭을 수용체의 진피에 이식하는 것을 포함한다. 만일 당해 목적이 원생동물, 세균 또는 바이러스와 같은 병원체에 대해 개체를 면역화시키는 것이라면, 적당한 면역원, 예를 들면 B형 간염 표면 항원, 바이러스 피막 단백질, 세균의 웨티드 아단위

또는 원생동물 표면 항원, 또는 기타 웨티드계 면역원이 당해 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화될 것이다. 이러한 경우에, 본 발명의 방법에 따라 변형된 모낭의 이식, 또는 조직배양된 조직 샘플이 일반적으로 사용될 수 있다. 상기한 바와 같이, 조직배양된 샘플로는, 피부외에, 림프 조직 또는 종양 조직이 포함될 수 있다. 또한, 실제로, 호르몬 또는 치료제, 예를 들면 FSH, LH, 사람 성장 호르몬, 갑상선 자극 호르몬, 옥시토신, 칼시토닌, 조직 플라스미노겐 활성인자, 에리토포이에틴, 각종 사이토okin(예: 인터루킨) 등을, 이들을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 제공하여 투여함으로써 피험체의 대사를 변화시키는 것이 본 발명의 범위에 속한다. 국소 및 전신 효과가 모두 초래될 것이다. 일반적으로 변형된 모낭 또는 조직배양된 절편의 이식이 사용될 수 있다.

<27> 상기한 바와 같이, 목적하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 나출형 DNA로서 제공될 수 있으나, 발현을 위한 조절 서열을 제공하는 작제물을 형태로 이들 뉴클레오티드 서열을 제공하는 것이 바람직하다. 또한, 이들 작제물은, 모낭 또는 조직 샘플에서 바이러스 벡터에 의해 실현된 감염에 의한 세포의 형질도입을 위한 기작을 제공하거나, 또한, 리포렉션, 리포좀의 사용, 전기천공 등과 같이 표적 세포를 형질도입하기 위한 또 다른 수단이 사용될 수 있다.

<28> 모낭 또는 조직을 상기한 유전자 작제물을 함유하도록 변형시킨 경우, 이들을 적합한 수용체에 이식시킨다. 모낭 및 조직, 예컨대 모낭을 지닌 조직을 수용 피험체에 이식하는 기법은 당업계에 의해 공지되어 있다. 조직배양된 모낭 또는 조직은 온전한, 조직화된 이식물로서 제공된다.

<29> 이식물의 수용체인 피험체는 포유동물 피험체이다. 이식된 조직의 거부반응을 예방하기 위해, 당해 수용체는 모낭 또는 배양된 조직의 공여체와 유전적 동계이거나, 수용체가 면역약화(immunocompromised)되는 것이 바람직하다. 사람에서 동종이식 상태하의 모낭을 이식하는 것이 특히 공지되어 있다. 유사하게, 사람 피험체에서, 예를 들면 개체 자신의 진피 조직이, 동일한 피험체에 재이식하기 전에 유전자를 변형시키기 위한 매우 바람직한 선택이다. 그러나, 몇가지 이유로, 동일한 개체의 진피가 사용될 수 없는 경우, 또 다른 공여체로 부터의 조직의 이식에는, 종래와 마찬가지로, 면역억제제의 투여가 수반된다.

<30> 유사한 고려사항이, 면역원, 호르몬 또는 치료학적 화합물을 생성하는 핵산 작제물을 투여하기 위한 수의학 용도에 대해서도 적용된다.

<31> 실험실용으로 사용하기 위한 관점에서, 이식 기법은 이러한 유전자 치료법에 의해 도입된 단백질의 효과가 평가될 수 있도록, 변형된 피험체를 생산하는데 유용하다. 실제로, 당해 기법은 유전자전이된(transgenic) 피험체를 생산하며, 이를 후에 실험 모델로서 사용하여 당해 모델 시스템에 다른 물질을 투여한 효과를 평가할 수 있다. 이와 관련하여, 변형된 당해 조직은 동일한 피험체 또는 유전적동계 피험체로 부터 유래될 수 있거나, SCID 마우스 또는 누드 마우스와 같이 면역약화된 수용체가 임의의 공급원으로부터 유래된 조직을 위한 수용체로서 사용될 수 있다. 이러한 쥐의 면역약화된 피험체외에, 다른 포유동물이 방사선 또는 면역억제제에 의해 면역약화될 수 있다[참조 문헌: Hodgin, E.C., et al., M.J.Vet. Res.(1978) 39:1161-1167; Perryman, L.E., et al., Thymus(1984) 6:263-272; in dogs, by Roth, J.A. et al., M.J. Vet.Res. (1984) 45:1151-1155; and in monkeys by Baskin, G.B., Am. J.Pathol. (1987) 129-345-352].

<32> 따라서, 모든 포유동물 피험체가 변형된 조직화된 조직 또는 모낭의 이식을 위한 수용체로서 적합하다. 피험체에는, 사람이외에도, 가축 피험체, 예를 들면 말, 소, 돼지, 양, 개, 및 고양이는 물론 실험용 동물, 예를 들면 토끼, 마우스 및 랫트가 포함된다.

<33> 수용체 부분에 충분히 면역약화된 상태를 보장하는 조치가 취해진다면, 임의의 공급원으로부터의 조직을 수용체로 이식하는데 사용할 수 있지만, 본 발명의 이점중의 하나는, 진피 조직 및/또는 모낭을 유전자 작제물의 전달을 위한 비히클로서 사용함으로써, 종종 동종이식편을 이용할 수 있다는 점이다. 이를 통해, 그렇지 않은 경우 면역약화 노력이 따라야 하는 까다로운 문제를 피할 수 있다.

실시예

<34> 하기의 실시예는 설명을 위한 것이지, 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다.

<35> GFP-형질도입된 모낭 및 모간을 평가하는 방법

<36> 모낭 및 GFP-양성 모낭의 수를 명시야 현미경 및 형광시야 현미경하에서 측정하였다. 0.581mm^2 의 면적에 이르는, 5회 무작위로 선택된 현미경 시야(200x 배율의 1 시야)로 부터의 모발의 평균 수를 기초로 하여 계산을 하

였다. 그룹당 500개 이상의 모발을 계수하여 GFP-양성 모낭의 %을 산출한다. 모구와 모간 어디에서든 GFP가 가시화되는 모낭을 GFP 양성으로서 기록하였다.

<37> 수은 50W 램프 전원이 구비된 레이카(Leica) 형광 스테레오 현미경 모델 LZ12(Leica Inc., Deerfield, IL) 및 니콘(Nikon)(일본 토교 소재) 형광 현미경을 사용하였다. 방출된 형광성을, Hamamatsu C5810 3-칩 한색(cooled color) CCD 카메라(Hamamatsu Photonics Systems, Bridgewater, NJ)상에서 롱-패스 필터 GG475(Chroma Technology, Brattleboro, VT)를 통해 수집하였다.

<38> 바이러스 GFP 형질도입 후, 피부 조각을 조직학적 연구를 위해 여러 시점에서 취하여, GFP 발현의 위치를 측정하였다. 조직배양된 피부 또는 피부 이식편의 조각을 배양 배지중의 제I형 콜라겐아제 용액 2mg/ml에서 2시간 동안 37°C에서 항온처리하고, 모낭을 방출시키기 위하여 배양 배지에서 세정하였다. 달리, 조직학적 연구를 위해, 조직배양된 피부 또는 피부 이식편을 -80°C에서 보관하였다. 동결된 표본을 저온장치(cryostat)(Hacker Instruments, Inc., Fairfield, NJ)상에서 절단하고, 유리 슬라이드(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)상에 수집하였다.

<39> 또한, RNA를 조직배양된 또는 이식된 피부로 부터 분리하여, RT-PCR를 수행하였다. 피부 샘플(100mg)을 TRI 시약(Sigma, St. Louis, MO) 1ml중에서 균질화하여 RNA(13, 14)를 추출하였다. RT-PCR를 위해, 약 10μg의 RNA를 제1 cDNA 쇄로 역전사시켰다. 역 전사를 20μl의 제1쇄 완충제, 500 μM의 각 dNTP, 및 20단위의 AMV 역전사효소(Strategene, San Diego, CA)하에서 수행하였다. 제1쇄에 대한 프라이머는 pGFP안티센스이였다. 50분간 42°C에서 항온처리하였다. 이어서, 역전사의 생성물을 PCR로 증폭시켰다. 마우스 β-액틴 mRNA를 표준물로서 사용하였다. 대조군으로서, 마우스 β-액틴(514bp)를, GFP-양성 및 음성 피부 둘다로 부터 추출된 RNA에서 RT-PCR로 증폭시켰다. GFP 상류 프라이머의 서열은 5'-ATG GCT AGC AAA GGA GAA CT-3' 이였다. 하류 프라이머는 5'-TCA GTT GTA CAG TTC ATC ACT G-3' 이였다. GFP 및 β-액틴 모두에 대한 PCR 조건은 다음과 같다: 97°C에서 30초간 제1 변성; 55°C에서 30초간 어닐링; 및 72°C에서 45초간 연장; 및 72°C에서 10분간 최종 연장.

<40> 실시예 1

<41> 조직배양된 피부의 모낭의 유전자 변형

<42> C57BL/10 및 알비노 마우스를 당해 연구에서 사용하였다. 모낭은 변형되었을 때 성장기에 있었다. 당해 연구에서 사용된 6일령 마우스의 모낭은 본래 성장기에 있었다. 마우스의 핑크색으로 판단하건대 휴지기 상태였던, 당해 연구에서 사용된 8주령의 마우스를 마취시키고, 3 x 5cm의 등 부위를 왁스로 탈모시켜 모낭이 동조화된 성장기가 되도록 처리하였다; 즉, 8주령 마우스의 모낭은 본래는 휴지기에 있었으나, 등 부위를 탈모시킨 지 6일 후에 성장기로 전환되었다.

<43> 각 경우에, 피하 조직을 제거하고, 1mm x 2mm의 조각으로 절단하였다. 당해 피부 조각을 조직배양하였다. 조직배양된 표본의 일부를, 배양 배지(RPMI 1640, 10% FBS)중의 콜라겐아제 용액 2mg/ml에서 1 내지 2시간 동안 37°C에서 항온처리하는 방법으로 콜라겐아제로 처리하였다. 이어서, 콜라겐아제로 처리한 조직배양물을 PBS로 세정하였다.

<44> 보다 상세히, 동물을 탈모 후 6일째에 경부 탈구시켜 희생시켰다. 등 피부를 서브쿠이티스(subcuitis)의 수준에서 절개하였다. 피하 조직을 제거하고 피부를 칼슘- 및 마그네슘-부존재 포스페이트 완충 염수(CMF-PBS, pH7.4)로 세정하였다. 피부 샘플을 작은 조각(1mm x 1mm ~ 2cm x 2cm)으로 절단하였다. 표본의 일부분을, 10% 태아 소 혈청(FBS)를 함유하는 RPMI 1640에서 배양된 미처리된 대조군으로서 직접 사용하였다. 표본의 나머지를, 배지중의 제I형 콜라겐아제(Sigma, St. Louis, MO) 용액 2mg/ml에서 45분 내지 3시간 45분 동안 37°C에서 항온처리하고 CMF-PBS로 세정하였다.

<45> 미처리된 배양물 및 처리된 배양물 둘 모두를 가습화된 5% CO₂/95% 공기중에서 37°C로 항온처리하고, 배양 배지 ml당 2.4 x 10⁶ 내지 5.0 x 10⁹ 플라크 형성 단위(PFU)에서 90분간 pQBI-AdCMV5GFP(Quantum, Montreal, Quebec)로 감염시킨 다음, 신선한 RPMI 1640(10% FBS)에서 1 내지 6시간 동안 37°C에서 항온처리하였다. 이어서, 녹색 형광 단백질(GFP)의 발현을 수 일 동안 관찰하였다. 그 결과는 표 1에 제시되어 있다. 성공적인 유전자 변형이 콜라겐아제의 존재 및 부존재하에서 달성되나, 콜라겐아제 처리에 의해 향상됨을 알 수 있다.

표 1

<46> 조직배양된 피부의 모낭에서 아데노바이러스-전달된 GFP의 발현

	콜라겐아제 존재			콜라겐아제 부존재		
	모낭의 수	GFP-양성 모낭의 수	GFP-양성 모낭 %	모낭의 수	GFP-양성 모낭의 수	GFP-양성 모낭 %
1일	98±3.46	57±13.08	58.09±12.9	51±2.83	11±2.83	21.98±0.95
2일	94±15.1	61±12.49	64.73±5.07	58±12.08	13±1.41	22.84±2.1
3일	82±3.46	55±6.93	67.03±7.28	58±7.87	16±1.41	28.16±4.82

<47> 유사한 실험에서, 콜라겐아제-처리된 피부 조직배양물 및 콜라겐아제-미처리된 피부 조직배양물 둘 모두를 2.4×10^6 내지 5.0×10^9 pfu/ml 범위의 아데노바이러스 GFP로 2.5시간 동안 37°C에서 처리하였다. GFP-형질도입 후 3일째에, 콜라겐아제-처리된 조직배양물에서 GFP 양성 모낭의 수는 보다 높은 바이러스 역가를 나타내며 최대 80%까지 증가하였다. 미처리된 조직배양물에서, GFP 양성 모낭의 수가 매우 적었으며, 바이러스 역가가 높아져도 단지 약간 증가하였으며, 콜라겐아제-처리된 조직배양물 보다 4배 적었다. 이들 결과는 도 2A에 도시되어 있으며, 이는 바이러스 역가에 의존적임을 보여준다.<48> 또 다른 유사한 실험에서, 콜라겐아제-처리된 조직배양물 및 콜라겐아제-미처리된 조직배양물 둘 모두를 3.4×10^8 pfu/ml의 아데노바이러스 GFP와 함께 1 내지 6시간 동안 37°C에서 항온처리하였다. 콜라겐아제-처리된 조직배양물에서 GFP-양성 모낭의 수는 4시간 까지는 바이러스 항온처리 시간에 따라 최대 80%까지 증가하였다. 4시간 후, 더 이상의 증가가 관찰되지 않았다. 미처리된 조직배양물에서, GFP-양성 모낭의 수가 매우 적었으며, 시간에 따라 단지 약간 증가하였다. 이들 결과는 도 2B에 도시되어 있다.

<49> GFP-양성 모낭의 수는 1시간 30분까지는 피부 조직배양물을 콜라겐아제로 처리한 시간에 따라 증가하였으나, 이후 그 수는 시간에 따라 감소하였다.

<50> 이들 실험에서, GFP는 아데노바이러스-GFP 처리 후 1일째에 조직배양된 피부의 모기질 세포에서 가시화되었다. 아데노바이러스-GFP 처리 후 3일째에, 모낭을 조직배양된 피부로 부터 분리하여 GFP 형광의 위치를 측정하였다. GFP는 모구 및 진피 유두중의 대부분의 세포에서 광범위하게 가시화되었다. 아데노바이러스 GFP 처리 후 7일째에, GFP는 조직배양된 피부의 모간에서 가시화되었다. 도 3A 참조. GFP-양성 및 음성 모간 및 부분적 GFP-양성 모간은 특이적 GFP 형광에 의해 분명히 구별되었으며, 생체외 아데노바이러스-GFP 유전자 처리 후 6일째에, GFP 형광이 콜라겐아제-처리된 조직배양된 피부의 모낭 79%에서 가시화되었다. 반대로, 미처리된 조직배양된 피부에서는 12%의 모낭만이 GFP 형광을 나타내었다. 도 3A 참조. 높은 GFP 형광성이 조직배양물에서 35일 이상 동안 모낭에서 유지되었다.

<51> 상이한 시점에서 모낭내 GFP 유전자의 발현을 확인하기 위하여, RT-PCR 분석을 사용하여, 아데노바이러스-GFP 유전자 형질도입된 조직배양된 피부에서 3, 6, 9, 12, 15 및 17일째에 GFP-특이적 mRNA를 검출하였다. 당해 RT-PCR 생성물로 부터 입증된 바에 따르면, GFP cDNA가 상기 시점에서 전체 RNA로 부터 특이적으로 증폭되었다. 전기영동 분석에 의해 입증된 바에 따르면, 아데노바이러스-GFP-형질도입된 조직배양된 피부로 부터 증폭된 생성물은 720bp의 예상된 크기를 가졌다. 감염되지 않은 조직배양된 피부로 부터 추출된 전체 RNA를 이용한 RT-PCR은 이 서열을 증폭시키지 않았다.

<52> 모든 경우에, 바이러스 관찰에 의하면, 조직배양된 피부의 모낭, 모구 및 진피 유두는 GFP의 발현을 나타내었다.

<53> 실시예 2<54> 변형된 조직배양물의 수용체로의 전달

<55> 모낭이 휴지기 상태인 8주령의 암컷 C57BL/10 마우스를 공여체로서 사용하였다. 등 부위를 왁스로 탈모시켜 성장기를 유도하여, 탈모한지 6일 후 성장기가 되었다. 조직을 등 부위로 부터 제거하여 작은 조각으로

절단하여, 배양하고, 콜라겐아제로 처리하고, 실시예 1에 기술된 바와 같이 GFP를 함유하는 아데노바이러스로 감염시켰다. 이어서, 당해 피부 조각을, 7주/3일령 암컷 누드 마우스의 등 부위에 이식하였다. 이식 후, 이식된 피부를 관찰한 결과, 모낭에서 GFP가 광범위하게 발현되고, 이러한 발현이 콜라겐아제로 예비처리함으로써 증가됨을 알 수 있었다.

<56> 보다 상세히, 생체내 전이유전자(transgene)의 발현을 가시화하기 위하여, 조직배양된 피부를, 바이러스 GFP 형질도입 후 누드 마우스 또는 C57BL/10 마우스에 이식하였다. 조직배양된 표본을 채취한지 24시간 이내에 이식하였다. 이식 수술을 충류식 후드에서 멸균 절차를 사용하여 수행하였다. 마우스를 케타민으로 마취하였다. 1 x 1cm의 피부 조각을, 수용체 마우스 피부를 근막에 이르기 까지 제거하여 수득한 유사한 크기의 베드에 이식하였다. 피부 이식편을 6-0 비흡수성 단일세사 봉합사로 고정시켰다.

<57> 모낭의 보다 광범위한 GFP 형광이, 미처리된 피부에서 보다 콜라겐아제-처리된 조직배양된 피부에서 가시화되었다. 이식 후 8일째에, GFP가, 피부 이식편중 최대 형광 부위의 모낭 75%에서 가시화되었다. 이식 후, 콜라겐아제-처리된 피부에서 GFP 형광을 나타내는 모낭의 %는 미처리된 피부의 모낭에서 보다 5.7배 높았다. 도 3B 참조. GFP는, 면역-결핍된 누드 마우스에 이식된 피부에 대하여 위에 기술된 바와 같이, 면역-능력있는 C57BL10 마우스에 이식된 GFP-아데노바이러스 처리된 피부에서 유사한 효율로 유사한 기간 동안 가시화되었다.

<58> RT-PCR을 GFP-형질도입된 이식된 피부상에서 6일, 8일 및 10일째에 수행하였다. GFP-특이적 mRNA는 마찬가지로 각 시점에서 증폭되었다. 이를 데이다는, 피부를 마우스에 이식한 후 10일 이상 동안 및 조직배양물에서의 17일 이상 동안 GFP 유전자 발현을 확인해 준다.

<59> 실시예 3

<60> 스트렙토마이시스(Streptomyces) 티로시나제 유전자, 상류 ORF-438 및 내부 리보좀 도입 부위(IRES)의 클로닝

<61> 스트렙토마이시스 안티바이오틱스(*Streptomyces antibioticus*) 티로시나제 유전자 및 ORF-438을 암호화하는 서열을, 아메리카 타입 컬쳐 콜렉션으로부터 수득된 플라스미드 pIJ702(ATCC#35287)로부터 PCR에 의해 증폭시켰다[참조 문헌: Katz, E., et al., J. Gen. Microbiol.(1983) 129:2703-2714].

<62> PCR 증폭을 위한 올리고머는 스트렙토마이시스 안티바이오틱스 티로시나제 유전자 및 ORF-438 cDNA의 서열에 따라 설계되었다[참조 문헌: Bernan, V., et al., Gene, (1985) 37:101-110]. 포유동물 세포에서 세균 유전자의 발현을 증가시키기 위하여, ORF-438 및 티로시나제 유전자 TGA 종결 코돈을 TAA로 변형시켰다. 코작(Kozak) 컨센서스 서열, GCCGCCACC를 각 경우에 ATG 개시 코돈 바로 앞의 상류에 부가하여, 해독 효율을 증가시켰다.

<63> 코작 컨센서스 서열을 포함하는 ORF-438 상류 프라이머의 서열은 다음과 같다: 5'-CGGAATTCGCCACCATGCCGGAACTCACCCGTC-3'.

<64> 하류 프라이머 서열은 다음과 같다:

<65> 5'-GGCTGATCATTAGTTGGAGGGGAAGGGGAGGGAGC-3'.

<66> 코작 컨센서스 서열을 포함하는 티로시나제 상류 프라이머의 서열은 다음과 같다: 5'-CTCGAGGCCGCCATGCCGTCCGAAGAACCA-3'.

<67> 하류 프라이머 서열은 다음과 같다:

<68> 5'-GGATCCTTAGACGTCGAAGGTGTACTGC-3'

<69> ORF-438 및 티로시나제 둘 모두를 위한 PCR 반응 조건은 다음과 같다: 97°C에서 10분간 제1 변성; 30초간 97°C에서의 변성 10회 사이클; 66°C에서 30초간 어닐링; 및 72°C에서 45초간 연장; 및 72°C에서 10분간 최종 연장.

<70> PCR 올리고머를, 레트로바이러스 벡터 pLISN[공급원: Clonetech (Palo Alto, CA)]중에 포함된 내부 리보좀 도입 부위(IRES)의 서열에 따라 설계하였다. 상류 프라이머의 서열은 다음과 같다:

<71> 5'-GGCTGATCATTGGCCCTCTCCCTCCCC-3'.

<72> 하류 프라이머 서열은 다음과 같다:

<73> 5'-AGCGGCCATTATCATCGTGTGTTCAAAGG-3'.

<74> IRES 유전자를 주형으로서 사용된 pLXIN으로 부터 PCR로 증폭시켰다. PCR 반응 조건은 다음과 같다: 96°C에서 10분간 제1 변성; 30초간 94°C에서의 변성 30회 사이클; 50°C에서 30초간 어닐링; 72°C에서 45초간 연장; 및 72°C에서 10분간 최종 연장.

<75> 전기영동 분석에 의해 입증된 바에 의하면, 증폭된 생성물은 ORF-438, 티로시나제 및 IRES 각각에 대해 438bp, 800bp 및 580bp의 예상된 크기를 가졌다.

실시예 4

레트로바이러스 벡터 pLme1SN 작제 및 패키징

<78> pLme1SN의 작제가 기술된다. 레트로바이러스 벡터 pLXSN(Clonetech, Palo Alto, CA)는 두 개의 프로모터, 즉 삽입된 유전자를 조절하기 위한 5'-장쇄 말단 반복체(5'-LTR) 및 네오마이신 포스포트랜스페라제(neoR)를 조절하기 위한 SV40 프로모터를 함유하는 쥐의 백혈병 바이러스계 벡터이다. 800bp 티로시나제 PCR 생성물을 XhoI으로 분해하고, pLXSN의 HapI/XhoI 클로닝 부위에 삽입시켜 pLtyrSN을 수득하였다. ORF-438 및 IRES PCR 생성물을 Bcl I 부위에서 연결한 후, pLtyrSN의 EcoRI/XhoI 클로닝 부위속에 삽입시켜 pLme1SN을 수득하였다. ORF-438 및 티로시나제 유전자 둘 모두를 pLme1SN중의 몰로네이(Moloney) 쥐 백혈병 바이러스 5'-LTR에 의해 유도한다. 5'-LTR 프로모터의 조절하에 ORF-438, IRES 및 티로시나제 유전자를 함유하는 이시스트론성(bicistronic) 서열이 당해 벡터내에 존재한다.

<79> pLme1SN을, 리포TAXI(Clonetech, Palo Alto, CA; Stratagene, San Diego, CA)를 사용하여 PT67 패키징 세포주 속에 형질감염시켰다. 형질감염된 PT67 세포주를 G418(Gibco BRL) 0.4mg/ml를 함유하는 DMEM 배지에서 선택하였다. G418-내성 세포를 클로닝하고 증대시켰다. G418를 사용한 선택적 배양의 2주 후, 양성 형질감염된 세포, PT67-me1를 수득하였다.

실시예 5

PT67-me1 세포에서의 발현

<82> ORF-438 및 티로시나제 유전자 둘 모두의 발현을 확인하기 위하여, RT-PCR 분석을 사용하여 형질감염된 패키징 세포에서 이들의 mRNA를 검출하였다. RT-PCR 생성물로 부터 입증된 바와 같이, 에스.안티바이오틱쿠스(S. antibioticus)로 부터의 티로시나제 및 ORF-438 유전자가 pLme1SN-형질도입된 PT7-세포의 전체 RNA로 부터 특이적으로 증폭되었다. 대조군으로서, PT67-me1 및 PT67 세포 둘 모두로 부터의 마우스 β -액틴을 RT-PCR로 증폭시켰다. 전기영동 분석에 의해 입증된 바에 의하면, PT67-me1 세포로 부터 증폭된 생성물은 티로시나제 및 ORF-438에 대해 각각 800bp 및 438bp의 예상된 크기를 가졌다. 감염되지 않은 PT67 세포로 부터의 전체 RNA를 이용한 RT-PCR 반응은 이들 단편을 증폭시키지 않았다.

<83> 보다 상세히, PT67-me1 세포를 트립신으로 분해하고, 원심분리로 펠릿화하였다. 전체 RNA를 구아니디움 티오시아네이트 방법[참조 문헌: MicroRNA Reagent Kit, Stratagene, San Diego, CA]으로 추출하였다. RNA를 260nm에서의 흡광도를 측정하여 정량화하였다. 전체 RNA 약 10 μ g을 제1 cDNA 쇄로 역 전사하였다. 역 전사를 20 μ l의 제1쇄 완충제, 500 μ M의 각 dNTP, 20단위의 AMV 역 전사효소(Stratagene, San Diego, CA)에서 수행하였다. 제1쇄를 위한 PCR 프라이머는 pORF-438 안티센스 및 pTyr 안티센스이였다. 샘플을 50분간 42°C에서 항온처리하였다. 역전사 생성물을 PCR 반응으로 증폭시켰다. 마우스 β -액틴을 RNA(Stratagene, San Diego, CA)의 특성을 조절하기 위한 표준물로서 사용하였다.

실시예 6

티로시나제 활성 분석

<86> 형질감염된 패키징 세포를, G418-내성 패키징 세포의 클론의 용해물에서 티로시나제 활성을 측정하는 방법으로, 활성 티로시나제 단백질의 발현에 대해 스크리닝하였다. 티로시나제 활성을 문헌[Nakajima et al. Pigment Cell Res (1998) 11:12-17]에 기재된 방법에 의해 분석하였다. pLme1SN-감염된 PT67 패키징 세포를 96웰 플레이트에서 2,000개 세포/웰의 밀도로 플레이팅하였다. 배양한지 24시간 후, 패키징 세포를 PBS로 세척하고, 1% 트리톤-100(45 μ l/웰)으로 용해시켰다. 친탕시켜 용해물을 혼합한 후, 5 μ l의 10mM L-DOPA를 각 웰에

첨가하였다. 30분간 37°C에서 항온처리한 후, 흡광도를 490nm에서 분광 광도계로 측정하였다.

<87> 또한, DOPA-옥시다제 반응을 사용하여, 온전한 형질감염된 PT67 세포에서의 멜라닌 생성을 검출하였다. 당해 세포를, PBS(pH 7.4)중의 DOPA 1mg/ml 및 티로신 2mg/ml와 함께 12시간 동안 37°C에서 전술한 바와 같이 항온 처리하였다[참조 문헌: Kugelman, T. et al. J. Invest Dermatol(1961) 37:66-73].

<88> 동일한 조건을 사용하여, 세포 상청액에서 490nm에서의 멜라닌 함량을 측정하였다. 도 3은, PT67 클론 1-4가 대조군 PT67 보다 많은 멜라닌을 생성한다는 것을 보여준다. 티로시나제-양성 세포는, 명시야 현미경으로 관찰된 갈색-멜라닌 과립의 생성에 의해 확인되었다. 갈색 색소 과립은 단지 pLme1SN-형질감염된 세포에서 관찰되었다.

<89> 실시예 7

<90> 알비노-마우스 성장기 모낭의 배양

<91> 8주령의 암컷 알비노 마우스 C57BL/6J-티로시나제(c-2J)를 잭슨 실험실(Jackson Laboratory)로 부터 구입하였다. 모발 주기의 성장기(성장기)를 등 피부에서 유도하였는데, 이 때 등 피부는 모발 주기의 휴지기(휴지기)에 있는 모든 모낭을 갖는다. 전신 마취 후, 따뜻한 약스/로진 혼합물을 도포한 후, 피부로 부터 벗겨내는 방법으로, 모든 휴지기 모간을 탈모시킴으로써 모낭이 성장기로 들어가도록 유도하였다[참조 문헌: Schilli J Invest Dermatol (1998) 111:598-604].

<92> 탈모 후 6일째에, 모든 모낭이 성장기에 있을 때, 마우스를 희생시킨 후 마우스의 등 피부를 수집하였다. 마우스 피부의 작은 조각(2 x 5 x 2mm)을 가위로 절단하고, HBSS에서 3회 세척하였다. 채취된 피부를, 항생제(젠타マイ신 100 μ g/ml, 시프로플록사신 10 μ g/ml, 암포테리신-B 2.5 μ g/ml, 페니실린-스트렙토マイ신 100IU-100 μ g/ml)를 함유하는 MEM(Sigma)에서 30분간 37°C에서 항온처리하였다. 당해 피부를 HBSS 배지로 3회 세척하여 잔류 항생제를 제거하고, 10% 태아 소 혈청 및 젠타マイ신이 보충된 Eagle 최소 필수 배지(MEM)에서의 조직배양을 위한 콜라겐-함유 겔속에 넣었다. 배양물을, 5% CO₂ 가스가 공급된 항온처리기속에서 37°C로 유지시켰다.

<93> 실시예 8

<94> 배양된 알비노-마우스 모낭의 감염

<95> 실시예 7의 조직배양된 알비노-마우스 피부를 아래와 같이 PT67-mel 세포와 공동-배양하였다:

<96> 가장 많이 생성된 클론으로부터 PT67-mel 세포를 계수하고, 24웰 플레이트에 시딩한 후, 80% 컨플루언스(confidence)를 이를 때 까지 37°C에서 성장시키고, 24웰 플레이트에서 12, 24 및 72시간 동안 조직배양된 알비노 피부와 함께 공동배양하였다. 이어서, 조직배양된 피부를, 신선한 MEM 배지를 사용하여 24웰 플레이트에서 단독-배양하고, 추가로 4 내지 6일 동안 항온처리하였다. 바이러스-감염된 피부의 작은 조각을 무작위로 채취하였다. 신선하고 동결된 절편을 표준 기술로 제조하였다.

<97> 레트로바이러스 감염 4일 후, 조직배양물의 모구 깊숙한 곳의 모기질에서 멜라닌이 관찰되었다. 또한, 멜라닌이 모낭의 상부에서 발견되었으며, 감염 6일 후 모기질 및 모간 모두에서 관찰될 수 있었다.

<98> 조직배양된 알비노 마우스 피부와 PT67-mel 세포를 24시간 동안 공동배양하는 과정을 포함하는 초기 실험에서, 피부 조직배양물 약 2.5 내지 15%가 멜라닌-생성 모낭을 함유하였다. PT67-mel과 함께 공동-배양되지 않은 조직배양된 알비노-마우스 피부에서 멜라닌이 관찰되지 않았다.

<99> 이어서, 시간-경과 실험을 수행하여, 알비노 피부와 PT67-mel의 공동-배양물의 항온처리 시간이 길수록 트로시나제 감염의 효율을 증가시키는지를 측정하였다. 조직배양된 피부의 감염 효율이 공동-배양의 시간에 따라 크게 증가하였다. 12시간의 공동-배양 후, 피부의 7%(30개 조각중 2개)가 멜라닌을 생성하였으며, 모낭의 15%(40개 조각중 6개)가 멜라닌을 생성하였다. 24시간의 공동-배양 후, 피부 조각의 25%(20개중 5개)가 멜라닌을 생성하였으며, 모낭의 35%(80개중 28개)가 멜라닌을 생성하였다. 72시간의 공동-배양 후, 피부 조각의 60%(20개 중 12개)가 멜라닌을 생성하였으며, 모낭의 53%(80개중 42개)가 멜라닌을 생성하였다.

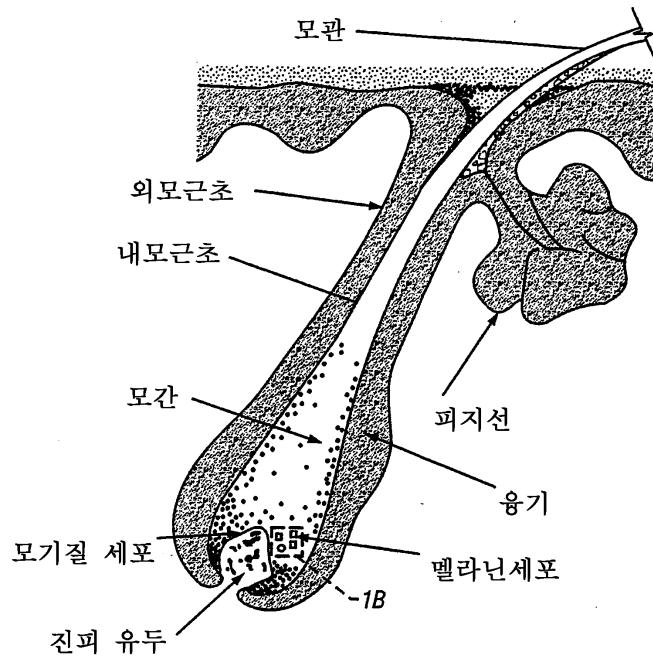
<100> 이들 결과는, 바이러스 역가 및 바이러스에 대한 노출 시간이 형질도입 빈도에 영향을 줄 수 있음을 제시한다.

도면의 간단한 설명

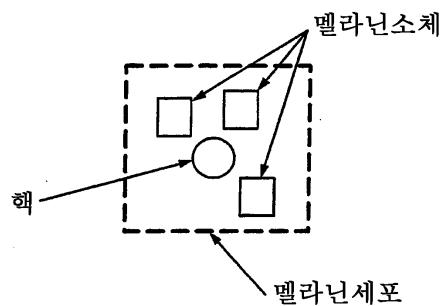
- <11> 도 1은 전형적인 모낭의 그림이다.
- <12> 도 2A 및 2B는, 콜라겐아제로 처리하거나 처리하지 않은 조직배양된 피부중의 아데노바이러스-전달된 GFP를, 바이러스 역가 및 바이러스 항온처리 시간의 함수로서 각각 그래프로 나타낸 것이다.
- <13> 도 3A 및 3B는 조직배양물 및 이식 피부중의 GFP의 지속성을 각각 보여준다.

도면

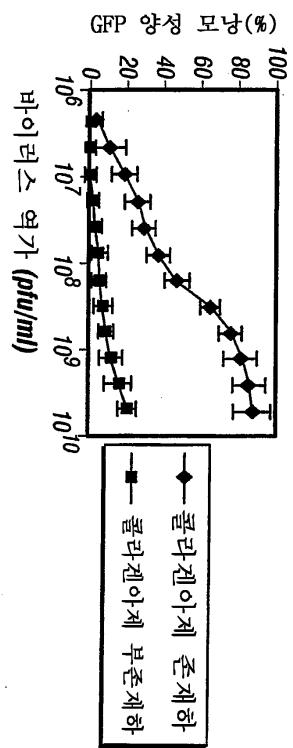
도면 1A



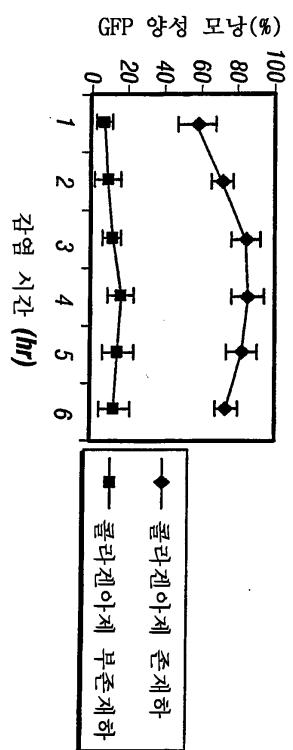
도면 1B



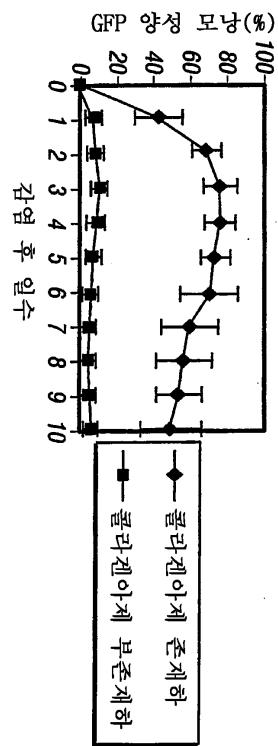
도면2A



도면2B



도면3A



도면3B

