

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
A61K 48/00

(11) 공개번호 10-2001-0020571

(43) 공개일자 2001년03월 15일

(21) 출원번호	10-1999-7012481		
(22) 출원일자	1999년 12월 29일		
번역문제출일자	1999년 12월 29일		
(86) 국제출원번호	PCT/FR 98/01400	(87) 국제공개번호	WO 99/01158
(86) 국제출원출원일자	1998년 06월 30일	(87) 국제공개일자	1999년 01월 14일
(81) 지정국	AP ARIP0특허 : 가나 감비아 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 짐바브웨		
	EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐 스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄		
	EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투 갈 스웨덴 핀란드 사이프러스		
	OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부와르 카 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고		
	국내특허 : 알바니아 오스트레일리아 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 쿠바 체코 에스토니아 그루지야 기네 비소 헝가리 인도네시아 이스라엘 아이슬란드 일본 대한민국 세인트 루시아 스리랑카 라이베리아 리투아니아 라트비아 마다가스카르 마케 도니아 몽고 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 싱가포르 슬로베니아 슬로바키아 시에라리온 터키 트리니다드토바고 우크라이 나 미국 우즈베키스탄 베트남 유고슬라비아		
(30) 우선권주장	97/08,233 1997년 06월 30일 프랑스(FR)		
(71) 출원인	60/067,488 1997년 12월 01일 미국(US) 아방티 파르마 소시에테 아노님 자끄 사비나 프랑스공화국 앙또니 에프-92160 아부뉴 레이몽-아롱 20인스티튜트 구스타브 루시 프랑스, 에프-94805 빌레쥬프, 뤼 까밀레 데스몰린스, 39상뜨로 나쇼날 드 라 러쉴르쉴 샹띠피크 요셉 백세라스		
(72) 발명자	프랑스 파리 에프-75016 뤼 미셸 앙즈 3 뤼로미셸 프랑스상클라우드 에프-92210세인트클로틸드스퀘어 1 미르루이 프랑스베리에르르뵈송 에프-91370알레데보뻬팡 22 쉴르망다니엘 프랑스빠리에프-75012뤼에라르 10		
(74) 대리인	차윤근		

심사청구 : 없음

(54) 황문근중으로 개선된 핵산 전달방법 및 이를 위한콤비네이션

요약

본 발명은 핵산 또는 전달 효율을 개선하기 위한 산물과 결합된 핵산을 생체내 황문근 세포중으로 전달하는 개선된 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 핵산과 유전자 요법에 유용한 전달 방법과의 콤비네이션에 관한 것이다.

대표도

도 1a

색인어

개선된 핵산 전달방법, 황문근 세포

명세서

기술분야

본 발명은 핵산 또는 전달 수송을 증가시킬 수 있는 산물과 결합된 핵산의 황문근 세포종으로 생체내 전달에 있어 매우 뚜렷한 개선 및, 핵산과 유전자 요법에 유용한 본 발명에 따른 전달방법의 콤비네이션에 관한 것이다.

배경기술

주어진 세포로의 유전자 전달은 유전자 요법에 있어 근간을 이루고 있다. 그러나, 한가지 문제점은 충분한 양의 핵산을 처리될 숙주 세포로 성공적으로 침투시키는데 있으며; 실제로, 이러한 핵산, 일반적으로 관련 유전자는 형질감염된 세포에서 발현되어야 한다. 이러한 관점에서 선택된 한가지 접근법은 핵산을 바이러스 벡터, 특히 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 아데노-관련 바이러스로 통합하는 것이었다. 이들 시스템은 바이러스에 의해 전개된 세포 침투 메카니즘, 및 파괴에 대한 보호 이점을 가진다. 그러나, 이러한 접근법은 단점, 특히 숙주 생물에 전이될 수 있는 감염 바이러스 입자를 생성할 위험을 가지며, 레트로바이러스 벡터의 경우, 삽입성 돌연변이의 위험을 가진다. 또한, 바이러스 게놈 중으로 치료 또는 백신 유전자의 삽입 능력이 제한된다.

어쨌든, 유전자 요법에 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 개발은 결손 바이러스 및 상보성 세포주에 대한 복합 기술의 사용을 요구한다.

또다른 접근법(Wolf et al. Science 247, 1465-68, 1990; Davis et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 7213-18, 1996)은 시험관내에서 우수한 형질감염제인 단백질, 리포솜, 전하를 띤 지질 또는 폴리에틸렌이민과 같은 양이온 중합체와 같이 형질감염을 촉진하는 화합물과 결합되거나 결합되지 않는 플라스미드성 핵산을 근육 또는 혈류중에 투여하는데 있다(Behr et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6, 1989; Felgner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7, 1987; Boussif et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 7297-301, 1995).

J.A. Wolff 등의 최초 간행물은 유리 플라스미드 형태로 주사된 DNA를 통합하는 근육 조직의 능력을 보여 주고 있어(Wolff et al. Science 247, 1465-1468, 1990), 다수의 발명자는 이 과정을 개선하려는 시도를 해왔다(Manthorpe et al., 1993, Human Gene Ther. 4, 419-431; Wolff et al., 1991, BioTechniques 11, 474-485). 이들 시험에서 밝혀진 몇몇 특정 경향은 하기와 같다:

- 조직상으로 추진된 비드상으로 DNA를 흡착시켜 세포종으로 DNA를 진입시키기 위한 기계적 용액의 사용 ("유전자 건")(Sanders Williams et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 2726-2730; Fynan et al., 1993, BioTechniques 11, 474-485). 이들 방법은 백신접종 방법에 효과적인 것으로 증명되었지만 이들은 조직의 상층에만 영향을 미친다. 근육의 경우, 이들의 사용은 입자가 피부 조직을 크로싱하지 않기 때문에 근육에 접근하기 위해서는 외과적 접근이 필요하다;

- 세포종으로 복합체의 진입을 촉진하는 비히클로 작용할 수 있는 분자와 결합하는 것을 제외하고는 유리 플라스미드 형태로 오래 머무르지 않는 DNA의 주사. 다수의 기타 형질감염법에 사용된 양이온 지질은 근육 조직 중으로 적용과 관련해 현재까지 만족스럽지 못한 것으로 증명되었는데, 이는 시험된 것들이 형질감염을 저해하는 것으로 밝혀졌기 때문이다(Schwartz et al., 1996, Gene Ther. 3, 405-411). 양이온 펩티드 및 중합체에도 동일하게 적용된다(Manthorpe et al., 1993, Human Gene Ther. 4, 419-431). 유일한 선호적인 콤비네이션의 경우는 DNA와 폴리(비닐 알콜) 또는 폴리비닐피롤리돈의 혼합으로 여겨진다. 이들 콤비네이션으로 인한 증가는 단지 네이키드 형태로 주사된 DNA와 비교해서 10 이하의 계수를 나타낸다(Mumper et al., 1996, Phrmaceutical Research 13, 701-709);

- DNA의 확산 및/또는 안정성을 개선시키거나(Davis et al., 1993, Hum. Gene Ther. 4, 151-159), 핵산의 진입, 예를 들어 세포 증가 또는 재생 현상의 유도를 개선하는 용액이 주사될 근육의 전처리. 처리법은 특히 국부 마취제 또는 칼디오톡신, 혈관 수축약, 엔도톡신 또는 기타 분자의 사용을 수반한다(Manthorpe et al., 1993, Human Gene Ther. 4, 419-431; Danko et al., 1994, Gene Ther.1, 114-121; Vitadello et al., 1994, Hum. Gene Ther. 5, 11-18). 이들 전처리 프로토콜은 효과적으로 취급하기가 어려운데, 부피바카인은 특히 치사량에 매우 근접한 양이 주사될 것을 요한다. 확산 개선을 위한 과삼투성 수크로스의 예비주사는 근육에서 형질감염 수준을 증가시키지 않는다(Davis et al., 1993).

전기천공, 또는 세포 투과를 위한 전기장의 사용도 시험관 내에서 배양 세포 중으로 DNA의 형질감염을 촉진하는데 사용된다. 그러나, 지금까지 이러한 현상은 역치에 따른 효과에 반응하고 이러한 전기투과는 동물 세포의 경우 800 내지 1200 볼트/cm의 비교적 높은 강도의 전기장의 경우에만 관측될 수 있는 것으로 여겨지고 있다. 이 기술은 생체내 인간의 고품 종양에서 블레오마이신과 같은 항종양제의 효능을 개선하는데 제안되어왔다(American Patent No. 5,468,228, L.M.Mir). 지속시간이 매우 짧은 펄스(100 마이크로초)의 경우, 이들 전기적 조건(800 내지 1200 볼트/cm)은 작은 분자를 세포내로 전달하는데 매우 적합하다. 이들 조건(100 마이크로초의 펄스)은 1000 볼트/cm 이하의 장이 충분히 효과적이지 않은 것으로 입증된, 생체내 간으로 핵산의 전달에 있어 개선점이 없고, 전기 펄스의 부재하에 DNA의 주사와 비교해 오히려 저해적으로 적용되어왔다(Patent WO 97/07826 and Heller et al. FEBS Letters, 389, 225-8, 1996).

실제로 이러한 강도의 장의 사용은 종양 조직의 치료에 문제점을 나타내지는 않지만 핵산이 종양 조직 이외의 조직, 특히 황문근에 투여될 경우 건강인 또는 환자에 주된 불리점을 가질 수 있는 정도 이상 또는

이하로 광범위한 조직 상처를 야기할 수 있기 때문에 이러한 기술의 생체내 적용에는 어려움이 있다.

인용된 모든 연구가 생체내에서 효과적인 1000 볼트/cm의 높은 전기장을 필요로 하지만, 실제로 예측하지 못했던 놀라운 방법으로, 본 출원인은 본 발명에서 근육중으로 핵산의 생체내 전달이 원하지 않는 효과없이, 근육에 낮은 강도, 예를 들어 100 내지 200 볼트/cm의 전기 펄스를 비교적 장기간 가함으로써 매우 상당히 증가될 수 있음을 보여준다. 또한, 본 출원인은 근육중으로 DNA 전달의 경우 기존에 관찰된 트랜스유전자의 발현에서 높은 변화가 본 발명에 따른 방법에 의해서는 상당히 감소됨을 관찰했다.

발명의 상세한 설명

따라서, 본 발명은 하나 이상의 횡문근중으로 생체내 핵산 전달방법에 관한 것으로, 여기서 근육 세포는 조직중으로 직접 투여 또는 국부 또는 전신 투여에 의해 형질감염될 핵산과 접촉되고, 1 내지 800 볼트/cm 강도의 전기 펄스를 1회 이상 근육에 적용시켜 전달이 이루어진다.

바람직하게는, 장 강도는 4 내지 400 볼트/cm이고 총 적용 지속시간은 10밀리초 이상이다. 사용된 펄스의 횡수는 예를 들면 1 내지 100,000 펄스이고 펄스의 진동수는 0.1 내지 1000 헤르쯔이다. 바람직하게는, 펄스의 진동수는 0.2 내지 100 헤르쯔이다. 펄스도 불규칙적인 방법으로 통해질 수 있고 시간의 함수에 따른 장 강도를 기술하는 함수가 달라질 수 있다. 예를 들어, 가해진 전기장은 짧은 단위 지속시간 (<1 msec)의 강도 > 400 V/cm, 바람직하게는 500 내지 800 볼트/cm의 최소 1회 장에 이은, 보다 긴 단위 지속시간 (> 1 msec)의 보다 낮은 강도, 예를 들면 <400 볼트/cm, 바람직하게는 <200 볼트/cm의 콤비네이션에 의한 것일 수 있다. 시간에 따른 전기장의 변화를 기술하는 함수의 적분은 1 kVxmsec/cm 이상이다. 본 발명의 바람직한 양식에 따르면, 이 적분은 5 kVxmsec/cm 이상이다.

본 발명의 바람직한 방식에 따르면, 펄스의 장 강도는 대략 30 내지 300 볼트/cm이다.

전기 펄스는 파장 펄스의 제곱, 지수함수적으로 감소하는 파장을 발생시키는 전기장, 한정된 지속시간의 진동 단극성 파장, 한정된 지속시간의 진동 양극성 파장, 또는 기타 파장 형태 중에서 선택된다. 본 발명의 바람직한 방식에 따르면, 전기 펄스는 파장 펄스의 제곱이다.

전기 펄스의 사용은 당해 분야의 숙련인에게 공지된 방법, 예를 들면:

- 처리될 조직의 한쪽 측면에 놓인 외부 전극, 특히 피부와 접촉하여 놓인 비침입성 전극 시스템,
- 조직에 이식된 전극 시스템,
- 핵산과 전기장을 동시 투여하는 전극/인젝터 시스템에 의해 수행될 수 있다.

본 발명의 구조내에서, 용어 1회 이상의 전기 펄스의 적용에 의한 DNA 또는 핵산의 전달, 및 용어 전기전달 또는 전기형질감염은 동일한 것으로 간주되고 전기장의 적용 또는 존재에 의해 핵산 또는 DNA의 전달을 나타낸다.

생체내에 투여하면, 때때로 비-침입성 외부 전극과의 전기적 연속성을 제공하는 중간 산물을 이용할 필요가 있다. 이는 예를 들면 겔 형태의 전해질일 수 있다.

핵산은 적절한 수단에 의해 투여될 수 있지만, 바람직하게는 근육으로 생체내 직접 주사되거나 또다른 경로, 국부 또는 전신 투여되는데, 이들은 전기장 적용 부위에 유용하도록 해준다. 핵산은 앞서 언급된 전달 허용 또는 촉진제와 함께 투여될 수 있다. 특히, 이들 핵산은 용액에서 유리되거나 합성제제와 결합될 수 있거나, 바이러스 벡터에 의해 운반될 수 있다. 합성 제제는 당해 분야의 숙련인에게 공지된 지질 또는 중합체, 또는 표적 조직의 막에 부착시키는 표적화 요소일 수 있다. 이들 요소 중, 당, 펩티드, 항체 또는 호르몬 수용체를 운반하는 벡터가 언급될 수 있다.

본 발명의 이들 조건하에, 핵산 투여가 전기장의 적용 직전, 이와 동시 또는 심지어 이후에 진행될 수 있음이 이해될 수 있다.

따라서, 본 발명의 주제는 동시, 따로따로 또는 일정한 시간 간격으로, 생체내 횡문근에 투여되는 콤비네이션 산물로서, 핵산 및 1 내지 800 볼트/cm 강도의 전기장이다. 바람직하게는, 장의 강도는 4 내지 400 볼트/cm이고, 좀더 바람직하게는, 장의 강도는 대략 30 내지 300 볼트/cm이다.

본 발명에 따른 방법은 유전자 요법에 사용될 수 있는데, 즉 전달된 유전자의 발현, 및 유전자의 조절 또는 블로킹이 특정 병리 조건을 치료할 수 있다.

바람직하게는, 근육 세포는

- 근육 세포 자체의 기능장애 수정(예를 들면 유전 결핍과 연관된 근질환의 치료를 위해),
- 또는 트랜스유전자에 의해 생성된 트로픽, 신경 친화성 및 안기오게닉 인자에 의한 근육 또는 기타 근육 또는 기관의 맥관형성 또는 신경지배의 보호 및/또는 재생,
- 또는 유전자 자체의 산물(예를 들면 혈전증 및 지혈, 트로픽 인자, 인슐린 등과 같은 호르몬의 조절 인자) 또는 치료 유전자의 첨가에 의해 근육에서 합성된 활성 대사물질과 같은 치료 효과를 야기하는 기관 분비 산물로 근육의 형질전환,
- 백신 또는 면역촉진제 적용을 허락하는 유전자 요법을 위해 처리된다.

본 발명의 또다른 주제는 국부, 피부, 경구, 질, 비경구, 비내, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피하, 안내 또는 경피 경로 등에 의해 횡문근으로 투여하도록 제형된 핵산을 함유하는 조성물과 전기장 펄스의 콤비네이션이다. 바람직하게는, 본 발명의 약학 조성물은 주사성 제형, 특히 원하는 기관으로의 직접 주사, 또는 기타 투여를 위해 약학적으로 허용가능한 비히클을 함유한다. 이들은 특히 등장성 멸균액 또는 건조, 특히 동결-건조된 조성물일 수 있는데, 경우에 따라서는, 멸균수 또는 생리 식염수의 첨가가 주사성 용액 제제를 만든다. 주사에 이용되는 핵산의 양과 투여 횟수 및 주사 분량은 각종 파라미터, 특히 사용된 투

여양식, 관련 병리 조건, 발현될 유전자, 또는 원하는 치료기간에 따라 달라질 수 있다.

핵산은 합성 또는 생합성 기원일 수 있거나, 바이러스 또는 원핵 세포 또는, 단세포 생물(예를 들어 효모) 또는 다세포 생물에서 유도된 진핵 세포로부터 추출될 수 있다. 이들은 기원 생물의 성분 및/또는 합성 시스템의 전부 또는 일부와 함께 투여될 수 있다.

핵산은 데옥시리보핵산 또는 리보핵산일 수 있다. 이는 천연 또는 인공 기원의 서열, 특히 게놈 DNA, cDNA, mRNA, tRNA 및 rRNA, 하이브리드 서열 또는 개질 또는 비개질된 올리고뉴클레오타이드의 합성 또는 반합성 서열일 수 있다. 이들 핵산은 당해 분야의 숙련인에게 공지된 기술, 특히 라이브러리 표적화, 화학 합성 또는 라이브러리를 표적화하여 얻어진 서열의 화학적 또는 효소적 개질을 포함하는 혼합법에 의해 얻어질 수 있다. 이들은 화학적으로 개질될 수 있다.

특히, 핵산은 DNA 또는 센스 또는 안티센스 RNA 또는 라이브라이프와 같이 촉매적 성질을 지닌 RNA일 수 있다. "안티센스"는 표적 서열에 상보적인 서열, 예를 들면 표적 서열과의 하이브리드화에 의해 추구되는 발현을 차단하는 mRNA 서열을 지닌 핵산을 의미하는 것으로 이해된다. "센스"는 표적 서열과 상동이거나 일치하는 서열, 예를 들어 단백질 전사 인자와 결합하고 주어진 유전자의 발현과 관련된 서열을 지닌 핵산을 의미하는 것으로 이해된다. 바람직한 양태에 따르면, 핵산은 관련 유전자 및, 관련 유전자를 발현시키는 요소를 포함한다. 유리하게는, 핵산 단편은 플라스미드 형태이다.

데옥시리보핵산은 일- 또는 이-분쇄, 및 짧은 올리고뉴클레오타이드 또는 보다 긴 서열일 수 있다. 이들은 치료 유전자, 전사 또는 복제 조절 서열, 또는 기타 세포 성분들과 결합하는 영역 등을 운반할 수 있다. 본 발명을 위해, "치료 유전자"는 특히 치료 효과를 지닌 RNA 또는 단백질 산물을 암호화하는 유전자를 의미하는 것으로 이해된다. 암호화된 단백질 산물은 단백질, 펩티드 등일 수 있다. 이 단백질 산물은 표적 세포(즉 후자가 병리 조건을 나타내지 않을 때 보통 표적 세포에서 발현되는 산물)와 관련하여 상동일 수 있다. 이 경우, 트랜스유전자의 발현은 예를 들면, 세포에서의 부적절한 발현 또는 개질로 인한 비활성 또는 약하게 활성인 단백질의 발현을 극복할 수 있거나, 상기 단백질을 과발현시킬 수 있다. 치료 유전자는 증가된 안정성 또는 개질된 활성 등을 지닌 세포 단백질의 돌연변이체를 암호화할 수도 있다. 단백질 산물은 표적 세포에 대해 이중일 수 있다. 이 경우, 발현된 단백질은 예를 들면, 세포에 결여된 활성을 보충하거나 제공할 수 있거나(근질환 또는 효소적 결손의 치료), 병리 조건을 퇴치하거나 면역 반응을 촉진할 수 있다.

본 발명을 위한 치료 산물 중, 좀더 구체적으로는 하기를 암호화하는 유전자가 언급될 수 있다.

- 효소, 예를 들면 α -1-안티트립신, 단백질분해효소(메탈로프로테이나제, 우로키나제, uPA, tPA, ... 스트렙토키나제), 활성 산물(ACE, ICE, ...)을 분비하는 전구체 절개 프로테아제, 이들의 길항제(TIMP-1, 조직 플라스미노겐 활성자 저해제 PAI, TFPI)
- 응집을 수반하는 인자와 같은 혈액 유도체: 인자 VII, VIII, IX, 보충 인자, 트롬빈,
- 호르몬, 또는 호르몬 합성 경로와 관련된 효소, 또는 호르몬의 합성 또는 분비를 제어하는 것과 관련된 인자 예를 들면, 인슐린, 인슐린 관련 인자(IGF) 또는 성장 호르몬, ACTH, 성호르몬 합성 효소,
- 림포카인 및 사이토킨: 인터루킨, 케모킨(CXC 및 CC), 인터페론, TNF, TGF, 케모택틱 인자 또는 MIF, MAF, PAF, MCP-1, 에오택신, LIF 등과 같은 활성자(프랑스 특허 92 03120),
- 성장 인자, 예를 들면 IGF, EGF, FGF, KGF, NGF, PDGF, PIGF, HGF, 프롤리페린
- VEGF 또는 EGF, 안기오포이에틴 1 또는 2, 엔도텔린과 같은 안기오게닉 인자
- 신경전달물질을 합성하는 효소
 - 트로픽 인자, 특히 신경 퇴화성 질환, 신경계를 손상시키는 외상, 또는 망막 퇴화 치료용 신경친화성 인자, 예를 들어 NGF, BDNF, NT3, NT4/5, NT6, 이들의 유도체 및 관련 유전자와 같은 뉴로트로핀과의 멤버 - CNTF, 악소킨, LIF 및 이들의 유도체와 같은 CNTF과 멤버 - IL6 및 이의 유도체 - 칼디오토핀 및 이의 유도체 - GDNF 및 이의 유도체 - IGF-1, IFGF-2 및 이의 유도체와 같은 IGF과 멤버
 - FGF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9 및 이의 유도체와 같은 FGF과 멤버, TGF β
 - 골격 성장 인자,
 - 에리트로포이에틴, GM-CSF, M-CSF, LIF 등과 같은 조혈 인자,
 - 디스트로핀 또는 미니디스트로핀(프랑스 특허 91 11947)과 같은 세포 구조 단백질, 자살 유전자(티미딘 키나제, 사이토신 데아미나제, 시토크롬 P450-항유 효소), 헤모글로빈 또는 기타 단백질 운반자용 유전자
 - 아포리포프로테인 A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J 및 apo(a) 중에서 선택된 아포리포프로테인 타입의 지질 대사와 관련된 단백질, , 예를 들어 리파제, 리포프로테인 리파제, 간 리파제, 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제, 7-알파-콜레스테롤 하이드록실라제, 포스파티딜 산 포스파타제와 같은 대사 효소, 또는 콜레스테롤 에스테르 전달 단백질 및 인지질 전달 단백질과 같은 지질 전달 단백질, HDL-결합 단백질 또는 예를 들어, LDL 수용체, 잔유물 칼로마이론 수용체 및 스캐빈저 수용체 중에서 선택된 수용체 등에 상응하는 유전자. 또한 비만증 치료를 위해 렙틴을 첨가할 수 있다.
 - NO, 안기오텐신, 브라디키닌, 바소프레신, ACE, 레닌의 대사와 관련된 효소, 프로스타글란딘 합성 또는 분비를 위한 메카니즘을 암호화하는 효소, 트롬복산, 아데노신, 아데노신 수용체, 칼리크레인 및 칼리스타틴, ANP, ANF, 디우레틱 또는 안티디우레틱 인자, 히스타민, 세로토닌, 카테콜아민, 뉴로펩티드와 같은 매개체의 합성, 대사 또는 방출과 관련된 인자와 같은, 혈압 조절 인자,
 - Tie-1 및 Tie-2를 위한 리간드, 안기오스타틴, ATF 인자, 플라스미노겐 유도체, 엔도텔린, 트롬보스폰딘 1 및 2, PF-4, α - 또는 β -인터페론, 인터루킨-12, TNF α , 우로키나제 수용체, flt1, KDR, PAI1,

PAI2, TIMP1, 프로락틴 단편과 같은 항-안기오게닉 인자,

- 아폽토시스에 대한 보호 인자, 예를 들면 AKT과,

- 카스파제와 같이 그들 자체적으로 활성이 있거나 기타 인자에 의해 활성을 필요로하는 "프로-드러그"형의 세포사 유도 단백질, 즉 세포사를 야기하는 제제중으로 프로-드러그를 활성화하는 단백질, 예를 들면 허프스바이러스 티미딘 키나제, 데아미나제, 이들은 특히 항양 요법에 이용될 수 있음,

- 세포간 접촉 및 부착과 관련된 단백질: VCAM, PECAM, ELAM, ICAM, 인테그린, 카테린,

- 세포외 매트릭스의 단백질,

- 세포 이동과 관련된 단백질

- FAK, MEKK, p38 키나제, 티로신 키나제, 세린-트레오닌 키나제를 포함하는 타입의 신호 형질도입형 단백질,

- 세포 사이클 조절과 관련된 단백질(p21, p16, 사이클린 등) 및 음성 돌연변이체 또는 세포 사이클을 차단하거나 아폽토시스를 적절히 유도할 수 있는 유도 단백질

- 전사 인자: jun, fos, AP1, p53 등 및 p53 신호 캐스케이드 단백질

- 세포 구조 단백질, 예를 들면 중간산물 필라멘트(비멘틴, 데스민, 케라틴), 디스트로핀, 근육 수축성 및 근육 수축성 제어와 관련된 단백질, 특히 칼슘 대사 및 세포내 칼슘 유동과 관련된 단백질(SERCA 등).

리간드 및 수용체 시스템을 통해 기능하는 단백질의 경우, 리간드 또는 수용체(예, FGF-R, VEGF-R 등)를 사용하는 것도 포함될 수 있다. 리간드 또는 수용체 단백질, 특히 총-길이의 단백질보다 큰 활성, 또는 길항제 활성, 또는 심지어 초기 단백질(예를 들면 세포막 고정과 관련된 이들 단편의 분비를 유도하는 서열과 결합되거나 결합되지 않은, 순환 단백질의 유용성을 저해하는 수용체 단편, 또는 요소 중 하나의 유용성을 전용하기위해 이들 리간드-수용체 시스템의 세포내 트래픽을 개질하는 기타 시스템)과 관련된 "우성-음성" 타입의 활성을 나타내거나 총 단백질(예, ATF)의 것보다 뚜렷한 고유 활성을 소유하는 앞서 언급된 단백질의 단편 또는 돌연변이체를 암호화하는 유전자가 언급될 수 있다.

근육에 의해 분비될 수 있는 기타 단백질 또는 펩티드 중, 항체, 다양한 일본새 항체 단편(ScFv) 또는 면역요법에 사용, 예를 들어 감염성 질환, 종양, 다발성 경화증(안티이디오타입 항체)과 같은 자가면역 질환의 치료를 위한 인식 능력을 보유하는 기타 항체 단편 및 예를 들어, 류마티스 관절염 치료를 위한 IL1 및 TNF α 와 같은 예비염증성 사이토키네 결합되는 ScFv를 주목함이 중요하다. 기타 관련 단백질은 비제한적인 방법으로, 예를 들어, 가용성 CD4 수용체 또는 항-HIV 치료를 위한 TNF용 가용성 수용체, TNF α 수용체 또는 류마티스 관절염 치료를 위한 가용성 수용체 IL1, 미아스테니아 치료를 위한 아세틸콜린용 가용성 수용체와 같은 가용성 수용체; 기질 펩티드 또는 효소 저해제, 또는 예를 들어, 천식, 혈전증, 재협착증, 전이 또는 염증 치료를 위한 수용체 또는 부착 단백질의 아고니스트 또는 길항제인 펩티드; 인공, 키메라 또는 결합된 단백질이다. 관련 필수 호르몬 중, 당뇨병의 경우 인슐린, 성장 호르몬 및 칼시토닌이 언급될 수 있다. 항종양 면역성을 유도하거나 면역 반응을 촉진할 수 있는 단백질도 언급될 수 있다(IL2, GM-CSF, IL12 등). 결국, IL10, IL4 및 IL13과 같이 T_H 반응을 감소시키는 사이토키네 언급될 수 있다.

본 발명의 적용 범위에는 하기의 다수 실시예가 포함된다.

치료 핵산은 안티센스 서열 또는, 표적 세포에서의 발현이 유전자의 발현 또는 세포 mRNA의 전사를 제어할 수 있는 유전자일 수도 있다. 이러한 서열은 예를 들면, 표적 세포에서 세포 mRNA에 상보적인 RNA로 전사될 수 있어 유럽 특허 140 308에 기재된 기술에 따라, 단백질로의 해독을 차단할 수 있다. 치료 유전자는 또한 라이보자임을 암호화하는 서열을 포함하는데, 이는 표적 RNA를 선택적으로 파괴할 수 있다(유럽 특허 321 201).

앞서 지적했듯이, 핵산은 인간 또는 동물에서 면역 반응을 유도할 수 있는 항원성 펩티드를 암호화하는 하나 이상의 유전자를 포함할 수도 있다. 이러한 특정 양태에서, 본 발명은 백신 생성, 또는 특히 미생물, 바이러스 또는 암에 대해 인간 또는 동물에 적용된 면역치료 요법을 수행한다. 이는 특히 엠스타인-바 바이러스, HIV 바이러스, 간염 B 바이러스(유럽 특허 185 573), 슈도-공수병 바이러스, "합포 형성 바이러스", 기타 바이러스에 특이한 항원성 펩티드, 또는 MAGE 단백질(유럽 특허 259 212), 예를 들면 MAGE 1, MAGE2 단백질과 같은 종양에 특이한 항원 또는 박테리아 열 쇼크 단백질과 같은 항-종양 반응을 촉진할 수 있는 항원일 수 있다.

바람직하게는, 핵산은 근육에서, 치료 유전자 및/또는 항원성 펩티드를 암호화하는 유전자를 발현시키고/발현시키거나 촉진하는 서열도 포함한다. 이들은 이들 서열이 형질감염된 세포에서 기능할 수 있을 때 고려된 유전자의 발현을 본래 담당하는 서열일 수 있다. 이들은 (기타 단백질의 발현, 또는 심지어 합성까지 담당하는) 상이한 기원의 서열일 수도 있다. 특히, 이들은 진핵생물 또는 바이러스 유전자의 프로모터 서열일 수 있다. 예를 들어, 이들은 형질감염을 원하는 세포의 계통에서 유도된 프로모터 서열일 수 있다. 진핵생물 프로모터 중, 특이한 방법 또는 비특이적인 방법으로 강하거나 약하게 유전자의 전사를 촉진하거나 억제하는 프로모터 또는 유도 서열이 언급될 수 있다. 이들은 특히 편재 프로모터(HPR1, 비멘틴, α -액틴, 튜불린 등), (MDR 또는 CFTR 타입 등)치료 유전자의 프로모터, (데스민, 마이오신, 크레아틴 키나제, 포스포글리세레이트 키나제용 유전자의 프로모터를 포함하는 타입의) 조직-특이성 프로모터 또는 천연 호르몬에 반응하는 프로모터와 같이 자극에 반응하는 프로모터(스테로이드 호르몬에 대한 수용체, 레티논산에 대한 수용체 등) 또는 항생제(테트라사이클린, 라파마이신 등)에 의해 조절된 프로모터, 피브레이트에 반응하는 프로모터와 같은 다이어트제에 반응하는 프로모터, 또는 천연 또는 합성 기원의 기타 분자에 반응하는 기타 프로모터일 수 있다. 또한, 이들은 바이러스 계통에서 유도된 프로모터 서열일 수 있다. 이러한 관점에서, 예를 들면, 아데노바이러스 E1A 또는 MLP 유전자의 프로모터, 또는 CMV, RSV 및 SV40 바이러스 등의 계통에서 유도된 프로모터가 언급될 수 있다. 프로모터는 유도성 또는 억제

성일 수 있다. 또한, 이들 발현 서열은 잠정적 또는 일시 발현 또는 조직-특이적 또는 우세 발현 등으로 허락하는 활성 또는 조절 서열을 첨가시켜 개질될 수 있다.

또한, 핵산은 특히 치료 유전자의 상류에 표적 세포의 분비 경로에서 합성된 치료 산물을 지시하는 신호 서열을 포함할 수 있다. 이 신호 서열은 치료 산물의 본래 신호 서열일 수 있지만, 또한 기타 기능성 신호 서열, 또는 인공 신호 서열일 수도 있다. 핵산은 예를 들어 페록시솜, 라이소솜, 및 예를 들어 미토콘드리아 유전 질환의 치료를 위한 미토콘드리아와 같이, 세포의 특정 구획쪽으로 합성된 치료 산물을 지시하는 신호 서열을 포함할 수도 있다.

관련 기타 유전자는 특히 McKusick, V.A. Mendelian(Inheritance in man, catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive, and X-linked phenotypes. Eighth edition, John Hopkins University Press (1988))과, Stanbury, J.B.등(The metabolic basis of inherited disease, Fifth edition, McGraw-Hill(1983))에 의해 기술되어왔다. 관련 유전자는 아미노산, 지질 및 세포의 기타 구성요소의 대사와 관련된 단백질을 포함한다.

예를 들어 프록토스-1-포스페이트 알돌라제, 프록토스-1,6-디포스파타제, 글루코스-6-포스파타제, 라이소솜 α -1,4-글루코시다제, 아밀로-1,6-글루코시다제, 아밀로-(1,4:1,6)-트랜스글루코시다제, 근육 포스포릴라제, 근육 포스포프록토키나제, 포스포릴라제- β -키나제, 갈락토스-1-포스페이트 우리딜 트랜스퍼라제, 복합 피루베이트 데하이드로게나제의 모든 효소, 피루베이트 카복실라제, 2-옥소글루타레이트 글리옥실라제 카복실라제, D-글리세레이트 데하이드로게나제와 같은 탄수화물 대사 질환과 관련된 유전자가 언급될 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

- 예를 들어 페닐알라닌 하이드록실라제, 디하이드로바이오테린 합성효소, 티로신 아미노트랜스퍼라제, 티로시나제, 히스티디나제, 푸마릴아세토아세타제, 글루타티온 합성효소, γ -글루타미실스테인 합성효소, 오르니틴- δ -아미노트랜스퍼라제, 카바모일포스페이트 합성효소, 오르니틴 카바모일트랜스퍼라제, 아르기니노숙신에이트 합성효소, 아르기니노숙신에이트 리아제, 아르기나제, L-라이신 데하이드로게나제, L-라이신 케토글루타레이트 리덕타제, 발린 트랜스아미나제, 루신 이소루신 트랜스아미나제, 측쇄 2-케토산의 데카복실라제, 이소발레릴-CoA 데하이드로게나제, 아실-CoA 데하이드로게나제, 3-하이드록시-3-메틸글루타릴-CoA 리아제, 아세토아세틸-CoA 3-케토티올라제, 프로피오닐-CoA 카복실라제, 메틸말로닐-CoA 유타제, ATP:코발라민 아데노실트랜스퍼라제, 디하이드로폴레이트 리덕타제, 메틸렌테트라하이드로폴레이트 리덕타제, 시스타티오닌 β -합성효소, 살코신 데하이드로게나제 복합체, 글리신 절개용 시스템에 속하는 단백질, β -알라닌 트랜스아미나제, 혈청 카르노시나제, 뇌 호모카르노시나제와 같이 아미노산 대사 질환과 관련된 유전자;

- 예를 들어 리포프로테인 리파제, 아포리포프로테인 C-II, 아포리포프로테인 E, 기타 아포리포프로테인, 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제, LDL 수용체, 간 스테롤 하이드록실라제, "피탄산" α -하이드록실라제와 같이, 지방 및 지방산 대사 질환과 관련된 유전자;

- 예를 들어 리소솜 α -L-이두로니다제, 리소솜 이두로네이트 솔파타제, 리소솜 헤파린 N-솔파타제, 리소솜 N-아세틸- α -D-글루코사미니다제, 리소솜 아세틸-CoA: α -글루코사민 N-아세틸트랜스퍼라제, 리소솜 N-아세틸- α -D-글루코사민 6-솔파타제, 리소솜 갈락토사민 6-설페이트 솔파타제, 리소솜 β -갈락토시다제, 리소솜 아릴솔파타제 B, 리소솜 β -글루쿠로니다제, N-아세틸글루코사미닐-포스포트랜스퍼라제, 리소솜 α -D-만노시다제, 리소솜 α -뉴라미니다제, 리소솜 아스파르틸글리코사미니다제, 리소솜 α -L-푸코시다제, 리소솜 산 리파제, 리소솜 산 세라미다제, 리소솜 스팅고마이엘리나제, 리소솜 글루코세레브로시다제 및 리소솜 갈락토세레브로시다제, 리소솜 갈락토실세라미다제, 리소솜 아릴솔파타제 A, α -갈락토시다제 A, 리소솜 산 β -갈락토시다제, 리소솜 핵소아미니다제 A의 α 체인과 같은 리소솜 결핍과 관련된 유전자도 언급될 수 있다.

스테로이드 및 지질 대사 질환과 관련된 유전자, 퓨린과 피리미딘 대사 질환과 관련된 유전자, 폴리핀과 핵 대사 질환과 관련된 유전자, 연결 조직, 및 골격 대사 질환과 관련된 유전자 및 혈액 질환 및 조혈 기관의 질환, 근육 질환(근질환), 신경계 질환(신경퇴화 질환) 또는 순환계 장치(예를 들어 허혈 및 협착증의 치료)의 질환 및 미토콘드리아 유전 질환과 관련된 유전자가 언급될 수 있지만 이에 한정되지 않는다.

본 발명에 따른 방법에서, 핵산은 예를 들어, 바이러스와 같은 벡터, 합성 또는 생합성제(예, 지질, 폴리펩티드, 글리코시드 또는 중합 체제), 또는 추진되거나 추진되지 않는 비드(이에 한정되지 않음)를 이용하여, 유전자 전달을 개선할 수 있는 벡터 타입 또는 이들 벡터의 콤비네이션과 결합될 수 있다. 핵산은 유전자 전달을 개선하기 위한 치료, 예를 들어 국부 또는 전신 적용에 의한 약리학적 치료, 또는 효소적, 투과성(계면활성제의 사용), 외과, 기계적, 열적 또는 물리적 치료가 행해진 조직에 주사될 수 있다.

유전자 요법에서 근육의 사용 이점은 다수의 요인에 있다.

- 수개월 이상의 트랜스유전자 발현의 놀라운 안정성 및 이에따른 근육내 또는 분비된 치료 단백질의 안정된 지속적인 생산을 가능케 함,
- 비-생한 기관으로 직접적이고, 빠른 위험하지 않은 투여를 가능케하는 근육 조직으로 손쉬운 접근,
- 복수 투여 부위를 허용하는 큰 범위의 근육 매스,
- 널리 입증된 근육의 분비 능력.

이들 이점에, 국부 및 표적화된 전기장의 사용과 연관된 국부 처리에 의해 제공된 안전성이 첨가될 수 있다.

약한 장의 사용과 연관된 이들 이점과 안전성 모두에 의해, 본 발명은 예를 들어 적당한 세동 제거기를 사용하여, 심장병 치료를 위한 심근 영역에 적용될 수 있다. 이는 또한 GAX 단백질과 같은 평활근 세포의 증식을 저해하는 유전자의 발현에 의해 재협착증의 치료에도 적용될 수 있다.

특히 생체내 근육에 적용되는, 매우 강하지도 않고 장기간에 걸쳐 투여되는 전기장의 콤비네이션은 조직

에 뚜렷한 손상을 야기함이 없이 핵산의 형질감염을 개선한다. 이들 결과는 핵산을 이용한 유전자 요법의 범위내에서 DNA 전달 수율을 개선한다.

결국, 본 발명에 따른 방법과 결합된 근육 조직의 이점은 최초로, 유전자 요법에 의해, 생리학적 및/또는 치료적인 양으로, 근육 세포내, 또는 근육 세포 근처 또는 혈류 또는 림프 순환계 중으로 분비된 제제를 생성할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 방법은 최초로, 예를 들어 복수 투여 부위를 지닌 형질감염될 근육 조직의 범위를 조절하는 가능성, 또는 전극의 수, 형상, 표면 및 배열을 조절하는 가능성으로 표현된 트랜스유전자의 효과량을 미세 조절 및 제어한다. 추가 제어 요소는 장 강도, 펄스의 횟수, 지속시간 및 진동수 및, 분명하게는 당해 분야의 상태에 따라, 투여될 핵산의 양과 용적을 변화시킴으로써 형질감염 효율을 조절하는 가능성에서 나온다. 따라서 원하는 생성 또는 분비 수준으로 적절한 형질감염 수준을 얻을 수 있다. 본 방법은 결국 생체내 유전자 전달을 위한 화학 또는 바이러스 방법과 비교해 안전성이 증가되는데, 이는 표적 기관이 아닌 기관의 영향은 완전히 배제되거나 제어될 수 없기 때문이다. 실제로, 본 발명에 따른 방법은 형질감염된 조직(국부 전기 펄스를 받은 조직 범위와 엄밀히 연관됨)의 국지화를 억제하여 이러한 조직의 비-생환력 및 재생 능력에 의해 가능할 경우 근육의 완전 또는 부분 제거에 의해 초기 위치로 되돌아갈 가능성을 제공한다. 이러한 굉장한 사용의 유연성은 동물중(의학 및 수의학 응용)에 따른 방법, 대상의 나이, 생리 및/또는 병리 상태를 최적화할 수 있다.

본 발명에 따른 방법은 또한, 최초로, 캡시드의 크기에 한정된 바이러스법과는 다른 큰 크기의 핵산을 형질감염시킬 수 있다. 이러한 가능성은 예를 들어 호르몬의 생리학적으로 조절된 생성에 필수적인, 인트론 및/또는 큰 크기의 조절 요소를 지닌 디스트로핀 또는 유전자의 것과 같이 매우 큰 크기의 유전자 전달에 필수적이다. 이러한 가능성은 에피솜 또는 효모 인공 염색체 또는 미니염색체의 전달에 필수적이다.

하기 실시예는 비제한적인 방법으로 본 발명을 설명하고 있다.

이들 실시예에서는, 하기 도면이 참조될 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1: 마우스에서 뇌 경골근 중으로 플라스미드 DNA pXL2774의 형질감염에 대한 높은 장 강도의 전기 펄스 효과; 평균값 \pm SEM,

도 2: 마우스에서 뇌 경골근 중으로 플라스미드 DNA pXL2774의 형질감염에 대한 중간 장 강도의 전기 펄스 효과; 평균값 \pm SEM,

도 3: 마우스에서 뇌 경골근 중으로 플라스미드 DNA pXL2774의 형질감염에 대한 낮은 장 강도 및 상이한 지속시간의 전기 펄스 효과; 평균값 \pm SEM,

도 4: 마우스에서 뇌 경골근 중으로 플라스미드 DNA pXL2774의 형질감염에 대한 낮은 장 강도 및 상이한 지속시간의 전기 펄스 효과; 평균값 \pm SEM,

도 5: 낮은 전기장 강도에서 마우스의 뇌 경골근 중으로 플라스미드 DNA pXL2774의 전기형질감염의 효율; 평균값 \pm SEM.

도 6: 마우스 뇌 경골근에서 루시퍼라제 발현의 동역학. 전기전달 존재(■) 및 전기전달 부재(X)하의 플라스미드 pXL2774의 투여; 평균값 \pm SEM.

도 7: 전기전달 존재(●) 및 전기전달 부재(□)하에서, 투여된 DNA 양의 함수에 따른 트랜스유전자의 발현 수준.

도 8: 전기전달 효율에 미치는 각종 타입의 전극의 효과.

도 9: 분비된 알칼라인 포스파타제의 혈청 농도의 동역학. 전기전달의 존재(■) 및 전기전달 부재(◆)하에 플라스미드 pXL3010의 투여; 평균값 \pm SEM.

도 10: 전기전달 존재(백색 히스토그램 막대) 및 전기전달 부재(흑색 히스토그램 막대)하에 근육에서 FGF1 발현의 동역학.

도 11: 플라스미드 pXL3179 및 pXL3212의 지도.

도 12: 플라스미드 pXL3388 및 pXL3031의 지도.

도 13: 플라스미드 pXL3004 및 pXL3010의 지도.

도 14: 플라스미드 pXL3149 및 pXL3096의 지도.

도 15: 플라스미드 pXL3353 및 pXL3354의 지도.

도 16: 플라스미드 pXL3348의 지도.

실시예

실시예 1: 전기장이 형질감염의 저해자임을 입증하는 기존의 조건하에 수행된 실험

기존에 사용되었고 앞서 논의된 것과 같은 표준 전기천공 조건을 시험해보면 비효과적이거나, 심지어 횡문근에서 핵산(플라스미드 DNA)의 전달에 저해 작용을 가짐이 입증되었다.

재료 및 방법 - 일반 작업 조건

본 실시예에서는, 하기 산물이 사용된다:

DNA pXL2774(특허 PCT/FR 96/01414)는 루시퍼라제에 대한 리포터 유전자를 포함하는 플라스미드 DNA이다. 기타 산물은 생산자로부터 입수 가능하다: 케타민, 자일라진, 생리 식염(0.9% NaCl).

오실로스코프 및 (장방형 또는 구형) 전기 펄스(전기펄스기 PS 15, Jouan, France)의 산업용 제너레이터를 사용한다. 사용된 전극은 15 mm 떨어진 평면 스테인레스강 전극이다.

마우스 C57 B1/6에서 실험을 수행한다. 상이한 우리에서 자란 마우스를 실험전에 임의로 분리한다("랜덤화").

마우스를 케타민과 자일라진 혼합물로 마취시킨다. 플라스미드 용액(0.9% NaCl 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 용액중 30 μl 용액)을 해밀턴 시린지를 이용하여 왼쪽 및 오른쪽 다리의 두개 경골근중으로 피부를 통해 세로로 주사한다. 두 전극을 전도성 겔로 코팅하고 주사된 다리를 이들과 접촉하는 전극 사이에 둔다.

전기 펄스를 주사 1분 후에 구형 펄스의 제너레이터에 의해 근육의 축에 수직으로 적용한다. 오실로스코프는 볼트의 강도(실시예에서 표시된 값은 최대 값을 나타냄), 밀리초 지속시간 및 가해진 펄스의 진동수 헤르쯔, 즉 1 Hz. 8 연속 펄스가 가해지도록 조절할 수 있다.

근육의 형질감염을 평가하기 위해, 플라스미드를 투여한지 7일만에 마우스를 무통 도살한다. 왼쪽 및 오른쪽 다리의 뇌 경골근을 옮겨와, 중량을 재고, 용해 완충액에 두어 그라운딩시킨다. 얻어진 현탁물을 원심분리하여 맑은 상등액을 얻는다. 기질이 용액에 자동적으로 첨가되는 시판 루미노미터에 의해 10 μl 상등액에서 루시퍼라제 활성을 평가한다. 루미네선스 반응의 강도는 현탁물의 총 용적을 알고있는 근육에 대한 RLU(상대적 루미네선스 단위)로 주어진다(1×10^6 RLU는 루시퍼라제 30 pg와 동일하다). 각 실험 조건을 10 포인트에서 시험한다: 양측면에 주사된 5 동물. 비-파라미터 시험에 의해 통계상 비교를 수행한다.

결과 및 토의

스케일이 직선이거나 대수인 두 도면이 결과를 설명한다.

이 초기 실험에서, 중앙의 전기전공을 허락하는 800 내지 1200 볼트/cm의 전기장의 효과를 시험한다(Mir et al. Eur. J. Cancer 27, 68, 1991).

도 1에 따르면, DNA가 전기 펄스없이 주사되는 대조 그룹과 비교해 하기의 것들이 관찰된다:

- 1200 볼트/cm 및 0.1 msec 지속시간의 8 펄스를 이용하면, 루시퍼라제 활성의 평균값은 낮아지고,
- 1200 볼트/cm 및 1 msec의 펄스를 이용하면, 3 동물이 죽고, 루시퍼라제 활성의 평균값은 낮아지며,
- 800 볼트/cm 및 1 msec의 펄스를 이용하면, 루시퍼라제 활성의 평균값은 상당히 감소된다.

전기장의 작용을 받는 대부분의 근육은 눈에 띄게 손상된다(약한 백색 외관).

실시예 2: 중간 강도의 전기장에서 핵산의 전기전달 실험

C57 B1/6 마우스를 이용하여 본 실험을 수행한다. 펄스의 전기장 강도 및 지속시간은 별도로 하고, 실시 조건은 표 1과 같다.

결과는 도 2에 도시되어 있다. 실시예 1의 결과가 재생되는데, 즉 루시퍼라제 활성에 대한 1 msec 지속시간의 800 볼트/cm에서 연속 8 펄스의 저해 효과가 근육에서 검출된다. 600 볼트/cm의 장을 이용하면, 근육 조직의 동일한 저해 및 동일한 손상이 관찰된다. 한편, 눈에 띄게 놀라운 방법으로, 전압의 감소는 더 이상 근육을 눈에 띄게 손상시킬 수 없고, 또한, 400 및 200 볼트/cm에서, 근육의 형질감염 수준은 평균적으로 장이 가해지지 않은 근육에서 얻어진 것보다 크다. (전기장을 받지 않은) 대조 그룹과 비교해, 루시퍼라제 활성값의 편차는 200 볼트/cm에서 감소됨을 주목해야 한다(SEM = 전기장없이 43.32%에 대한 평균값의 20.59%(도 2a)).

실시예 3: 트랜스유전자 발현의 매우 높은 축진을 보여주는 낮은 장 강도의 펄스를 이용한 핵산의 전기전달 실험

C57 B1/6 마우스를 이용하여 본 실험을 수행한다. 펄스의 전기장 강도 및 이의 지속시간, 및 펄스가 DNA 주사 후 25초만에 가해지는 사실을 제외하고는, 상기 실시예의 것과 실험 조건이 동일하다.

결과는 도 3에 도시되어 있다. 루시퍼라제 트랜스유전자 발현의 평균값은 100 볼트/cm에서 20 msec의 펄스 지속시간을 이용하면 200 볼트/cm에서 5 msec의 펄스 지속시간에서 뚜렷이 증가된다.

본 실험은 근육 중으로 DNA의 전기형질감염에 의해 얻어진 루시퍼라제 활성의 평균값이 200 및 100 볼트/cm의 전압을 사용할 경우에, 전기 펄스 지속시간의 함수인 것을 명확히 보여준다. 편차 값은 전기형질감염된 근육 그룹의 경우에 뚜렷이 감소함이 관찰된다(도 3a). 전기 펄스의 부재하에(대조), SEM은 평균값의 77.43%를 나타내지만 평균의 상대적 SEM은 14%(200 볼트/cm, 5 msec), 41.27%(200 볼트/cm, 20 msec) 및 전기장 100 볼트/cm에서 전기전달의 경우 30% 내지 48% 사이로 감소된다.

이 실험에 대한 최상의 조건하에, 트랜스유전자의 발현은 전기 펄스의 부재하에 주사된 대조와 비교해 계수 89.7로 개선된다.

실시예 4: 트랜스유전자의 발현에서 계수가 200 이상으로 증가됨을 보이는 200 볼트/cm에서 근육중으로 핵산의 전기전달 실험

DBA 2 마우스에서, 200 볼트/cm의 장 강도 및 다양한 지속시간의 전기 펄스를 이용하여 본 실험을 수행하는데, 기타 조건은 실시예 3의 경우와 동일하다.

본 실험은 200 볼트/cm에서, 루시퍼라제 활성의 형질감염이 5 msec의 펄스 지속시간에서 증가된 다음 보다 긴 지속시간을 위해 계속 증가됨을 확인한다(도 4 및 5). 또한, 전기형질감염시 비-전기형질감염된

대조와 비교해 SEM으로 표시된 개체간 변화에 있어 감소가 관찰된다(SEM의 상대값은 대조의 경우 35%이고 일련의 1,5,10,15,20 및 24 msec의 펄스의 경우에는 각각 25,22,16,18,16 및 26%임).

본 실험에 대한 최상의 조건하에, 트랜스유전자의 발현은 전기 펄스 부재하에 주사된 대조에 비해 계수 205로 개선된다. 가해진 각 펄스의 지속시간의 변화는 핵산 전달 효율을 조절하고 트랜스유전자의 발현 수준을 조정하는 수단인 것으로 여겨진다.

실시에 5: 산물 " 펄스 횟수 x 전기장 강도 x 각 펄스 지속시간"의 함수에 따른 핵산의 전기전달 효율

도 5는 산물 "펄스 횟수 x 장 강도 x 각 펄스의 지속시간"에 상응하는 파라미터의 중요성을 제시하고 있다. 이 파라미터는 실제로 시간의 함수에 따라, 전기장의 변화를 기술하는 함수의 적분에 상응한다.

200 V/cm, 100 V/cm의 전기장 강도 또는 전기장의 부재하에 실험 2, 3, 및 4동안 얻어진 결과가 도시된 도 5는 형질감염 효율이 장 강도에 의해 전기장에 노출되는 산물의 총 지속시간의 함수에 따라 증가함을 보여준다. 자극 효과는 산물 "전기장 x 펄스의 총 지속시간" 1 kVxmsec/cm 이상의 값의 경우에 얻어진다. 바람직한 방식에 따르면, 자극은 산물 "전기장 x 펄스의 총 지속시간" 5 kVxmsec/cm 이상이거나 이와 동일한 값의 경우에 얻어진다.

실시에 6: 전기 펄스의 지속시간의 증가 효과

본 실시예는 실시예 4에서 시험된 값 이상으로 펄스의 단위 지속시간을 증가시킬 수 있음을 설명한다.

본 실험은 C57B1/6 마우스로 수행한다. 사용된 플라스미드는 플라스미드 pXL2774이고, 투여된 DNA의 양은 15 μ g이다. 20 msec 이상의 지속시간의 전기 펄스를 통과시키는데 사용된 전기펄스기는 시판되는 전기 펄스기(미국 캘리포니아 샌 디에고 Genetronics, model T 820)이다. 전기 펄스는 횟수 및 지속시간이 달라질 수 있지만 200 볼트/cm의 일정한 장 강도를 가지고; 본 실험의 기타 조건은 실시예 1에 기재된 것과 같다. 결과는 표 1에 나타나 있다.

펄스 지속시간(msec)	0	1	5	10	20	30	40	50	60	80
실험 A 8 펄스	11 ± 5	39 ± 6	211 ± 26	288 ± 46	1158 ± 238	1487 ± 421	2386 ± 278			
실험 B 4 펄스	11 ± 5	26.8 ± 6	123 ± 17	246 ± 32	575 ± 88	704 ± 130		3440 ± 1077		
실험 B 4 펄스	15 ± 8						2885 ± 644		2626 ± 441	1258 ± 309

표 1: 근육당 백만단위 RLU의 루시퍼라제 활성의 평균값 +/- SEM. N은 각 그룹의 경우 10이다. 전기전달 조건: 전기장 강도 200 V/cm, 8 또는 4 펄스(다양한 단위 지속시간), 진동수 1 Hz.

펄스의 단위 지속시간이 연장됨에 따라 트랜스유전자의 발현 증가가 관찰된다(연속 8 펄스의 경우 적어도 40 msec이하 및 200 볼트/cm 강도의 연속 4 펄스의 경우 적어도 50 msec 이하). 본 실시예는 펄스의 최적 지속시간이 사용된 펄스의 횟수에 좌우되고 펄스의 단위 지속시간이 적어도 80 msec에 이를 수 있음을 보이는데, 지속 시간에 대한 이러한 값은 제한되지 않는다.

실시에 7: 전기 펄스의 횟수의 함수에 따른 전기전달 효율

본 실시예는 핵산 전달 효율에 미치는 전기 펄스 횟수의 증가 효과를 입증하고 있다.

본 실험을 C57B1/6 마우스에서 수행한다. 사용된 플라스미드는 플라스미드 pXL 2774이고, 투여된 DNA의 양은 15 μ g이다. 전기 펄스는 횟수를 달리할 수 있다. 각 펄스의 지속시간은 20 msec이다. 전기장 강도는 200 볼트/cm이다. 본 실험을 위한 기타 조건은 실시예 1에 기재된 바와 같다. 결과는 표 2에 나타나 있다.

펄스 횟수	0	1	2	4	6	8	12	16
총 RLU	70 ± 56	147 ± 26	281 ± 46	439 ± 50	678 ± 129	819 ± 73	929 ± 169	890 ± 137

표 2: 근육당 백만단위 RLU의 루시퍼라제 활성의 평균값 +/- SEM. N은 그룹당 10이다. 조건: 전기장 강도 200 V/cm, 20 msec의 다양한 펄스 횟수, 진동수 1 Hz.

루시퍼라제 발현이 1회 펄스 적용에서부터 상당히 증가되고, 펄스 횟수의 함수에 따라 계속적으로 증가함이 관찰된다. 따라서 가해진 펄스 횟수의 변화는 핵산 전달 효율의 조절과 트랜스유전자의 발현 수준 조정의 수단인 것으로 여겨진다.

전기전달되는 모든 그룹에 대한 평균과 비교해 SEM값의 감소에 의해 입증된 반응의 변화에 있어 감소가 확인된다.

실시에 8: 전기 펄스의 진동수의 증가 효과

본 실시예는 펄스의 진동수의 증가가 뜻밖에도 형질감염의 효율을 개선할 수 있음을 보여준다. 또한, 임

상적인 측면에서, 진동수의 증가는 총 치료 기간을 줄임으로써 환자의 안위를 도모해야 한다.

본 실험을 C57B1/6 마우스에서 수행한다. 사용된 플라스미드는 플라스미드 pXL 2774이고, 투여된 DNA의 양은 15 μ g이다. 전기 펄스의 진동수는 다양하다(0.1 내지 4 헤르쯔). 각 펄스의 지속시간은 20 msec이고, 전기장 강도는 200 볼트/cm이며, 본 실험의 기타 조건은 실시예 1에 기재된 바와 같다. 결과는 표 3에 나타나 있다.

진동수 헤르쯔	0	0.1	0.2	0.5	1	2	3	4
실험 A 8 펄스	5 ± 2	54 ± 13	95 ± 16	405 ± 60	996 ± 156	1528 ± 257		
실험 A 4 펄스		114 ± 14	163 ± 24	175 ± 26	337 ± 53	587 ± 90		
실험 B 8 펄스	21 ± 14				1294 ± 189	2141 ± 387	3634 ± 868	2819 ± 493
실험 B 4 펄스					1451 ± 228	1572 ± 320	1222 ± 126	2474 ± 646

표 3: 근육당 백만단위 RLU의 루시퍼라제 활성의 평균값 \pm SEM. N은 각 그룹당 100이다. 조건: 전기장 강도 200 V/cm, 20 msec의 8 또는 4 펄스, 다양한 진동수.

표 3의 실험 "A"에서 얻어진 결과는 최고의 진동수(≥ 1 Hz)가 두개의 연속 펄스(0.1 헤르쯔에서 10초) 사이의 좀더 긴 지속시간에 상응하는 낮은 진동수보다 좀더 효과적임을 보여준다. 형질감염 효율은 진동수에 따라 4 펄스의 경우 0.1 내지 4 헤르쯔 및 8 펄스의 경우 0.1 내지 3 헤르쯔에서 시험된 값 범위 이상으로 증가한다.

실시예 9: 시간의 함수로서 지수 감소에 따라 변하는 전기장의 적용 효과

본 실시예는 핵산 전달 효율에 미치는 지수 감소에 따라 변하는 전기장의 적용 효과를 입증하고 있다.

본 실험을 C57B1/6 마우스에서 수행한다.

사용된 플라스미드는 플라스미드 pXL 3031이다. 플라스미드 pXL3031(도 12)는 pGL3basic(Genbank:CVU47295)에서 얻어진 개질된 포티누스 피랄리스 루시퍼라제(세포질)를 암호화하는 luc+ 유전자가 인간 사이토메갈로바이러스 초기 영역(hCMV IE, Genbank HS51EE)에서 얻어진 프로모터 및 SV40 바이러스 후기 영역(Genbank SV4CG)의 폴리아데닐화 신호의 통제하에 도입된 플라스미드 pXL2774(WO 97/10343)에서 유도된 벡터이다. 투여된 DNA의 양은 10 μ g이다.

사용된 전기 펄스 제너레이터는 시간의 함수로서 지수 감소에 따라 변하는 전기장 강도의 펄스를 가할 수 있다(영국 켄트, Equibio electropulsator, model easyjectT plus). 가해진 전압은 지수 피크 전압이다. 두번째로 적용가능한 파라미터는 전달된 에너지의 양을 변화시킬 수 있는 전기용량(μ Farad)이고 지수 시간은 일정하다. 결과는 표 4에 나타나 있다.

	Capa μ F						
	150	300	450	600	1200	2400	3000
40 V/cm						1.23	11
100 V/cm				16.5	2.8	6.5	23.9
150 V/cm				1.8	3.5	6.1	
200 V/cm		5.1		15.8	18.8	121.5	189.7
300 V/cm	32.1	90.5	48.7	760.4	56.2		
400 V/cm		795					
600 V/cm	62						
800 V/cm	3.1	1.1					

표 4: 지수적으로 감소하는 펄스의 적용에 의해 얻어진 발현(루시퍼라제 활성) 증가 계수. 증가 계수는 전기전달없는 플라스미드 pXL3031의 투여에 의해 얻어진 루시퍼라제 활성을 참조하여 계산된다(증가 계수의 평균값, N은 조건당 4 내지 6).

비교에 의하면, 구형 펄스를 지닌 전기장의 존재하에(200 V/cm의 전기장 강도, 20 msec의 8 펄스, 1 헤르쯔의 진동수에서) pXL3031의 전달의 경우에 얻어진 발현 증가 계수는 동일한 실험에서 44이다.

이들 결과는 시간의 함수에 따른 구형 또는 지수적으로 감소하는 강도의 전기 펄스를 사용할 수 있음을 보여준다. 또한, 후자의 경우, 발현에 있어 실질적인 증가는 낮은 전기장 값 및 높은 전기용량(예, 200 V/cm, 전기용량 3000 μ Farad) 또는 높은 전기장 값 및 낮은 전기용량(예, 400 V/cm, 전기용량 300 μ Farad)의 경우에 얻어질 수 있다.

실시예 10: 높은 전압의 짧은 펄스 및 낮은 전압의 얼마간 긴 펄스의 콤비네이션 효과

본 실시예는 가해진 전기장이 짧은 지속시간, 예를 들면 50 또는 100 μ sec동안 500 내지 800 볼트/cm 사

이의 적어도 하나의 전기장과, 긴 지속시간, 예를 들어 본 실험에서 ≥ 1 msec 및 90 msec 이하동안 적어도 하나의 약한 전기장(<100 볼트/cm)의 콤비네이션일 수 있다.

낮은 전기장 값은 1 헤르쯔의 진동수를 이용하여 90 msec의 지속시간의 4 펄스에서 적용된 80 V/cm이다. 본 실험의 경우, 두개의 전기펄스기가 사용된다. 전기 펄스는 하나 및 나머지 장치에 의해 적용되고, 수동식 제어에 의해 1초 이하로 변화가 이루어진다.

사용된 플라스미드는 플라스미드 pXL3031이다. 투여된 DNA의 양은 3 μ g이다. 전기장 값은 표 5에 나타나 있고; 본 실험의 나머지 조건은 실시예 1에 기재되어있다.

전기장 적용 조건	실험 1(3 μ g pXL3031)	실험 2 (3 μ g pXL3031)
대조(전기장 없이)	320 +/- 126	75 +/-27
A1: 500 V/cm, 1 x 0.1msec	-	169 +/-63
A3: 800 V/cm, 1 x 0.1msec	416 +/- 143	272 +/-84
B: 80 V/cm, 4 x 90 msec	1282 +/- 203	362.21 +/-85.17
조건 A1에 이은 B	-	1479 +/-276
조건 A3에 이은 B	3991 +/- 418	1426 +/-209
조건 B에 이은 A3	-	347 +/-66

표 5: 근육당 백만 단위 RLU의 루시퍼라제 활성의 평균값 +/- SEM. N은 그룹당 10 근육이다.

일련의 두 실험의 경우에 얻어진 결과를 요약한 표 5은 고 전압의 짧은 펄스 또는 낮은 전압의 4회 연속 긴 펄스가 전기장이 가해지지 않은 것을 제외하고는 pXL3031의 주사를 받은 대조 그룹과 비교해 형질감염을 거의 증가시키지 못함을 보여준다. 약한 전기장 펄스가 높은 전기장 펄스 보다 앞서 적용될 때도 동일하다.

한편, 일련의 두 실험에서, 높은 전압의 짧은 펄스에 이은 낮은 전압의 4회 연속 긴 펄스의 콤비네이션은 DNA의 전달 효율을 매우 뚜렷하게 증가시킨다.

실시예 1과 2에서 얻어진 결과는 1 Hz에서 1 msec의 단위 지속시간의 600, 800 또는 1200의 8 펄스가 상처를 야기하고 형질감염을 저해시킴을 보여준다. 실시예 10에서 얻어진 결과는 특정 조건하에, 상처를 내지 않는 방법으로 높은 전압 전기장 강도를 사용할 수 있고; 실제로, 육안으로 관찰하면, 근육이 전혀 손상되지 않아 보인다. 보다 긴 지속시간의 약한 전기장과 조합된 짧은 지속시간의 높은 전기장의 사용은 DNA 전달 효율을 조절하는 추가적인 수단으로 여겨진다.

실시예 11: 상이한 크기의 플라스미드, 각종 프로모터의 통제하에 있는 유전자 또는 트랜스유전자에 의해 발현된 단백질의 다양한 어드레싱 부위를 이용한 전기전달

11.a - 상이한 크기의 플라스미드를 이용한 전기전달

루시퍼라제를 암호화하는 유전자를 포함하는 상이한 크기(2.8 kb, 3.8 kb, 8.6 kb, 20 kb 및 52.5 kb)의 플라스미드를 시험한다. 투여된 플라스미드의 양은 10 μ g/근육이다. 2 Hz에서 20 msec의 8 펄스로 200 V/cm의 강도를 지닌 전기장을 적용하며, 본 실험의 기타 조건은 실시예 1에 기재된 바와같다.

트랜스유전자의 발현 증가는 2.8 kb 및 3.8 kb의 플라스미드는 약 50배, 8.6 kb 플라스미드는 약 80배 및, 20 및 52.6 kb 플라스미드는 3 내지 6배가 관찰된다.

본 실험은 20 kb 이하 및 이상의 큰 크기의 플라스미드의 전달 가능성을 입증한다.

11.b: 루시퍼라제를 암호화하는 유전자의 부재하에 루미네선스 신호의 제어

대조로서, 루시퍼라제 활성 분석을 위해 관찰된 루미네선스 신호가 전기 처리 이후 조직에서 생성된 라디칼로 인한 가능성을 배제하기위해, 루시퍼라제 활성을 루시퍼라제를 암호화하지 않는 플라스미드로 처리되고 전기장이 가해진 근육에서 시험한다.

전기전달	-	-
β -갈락토시다제를 암호화하는 플라스미드 pXL 3004(15 μ g)	0.016 +/-0.005 (n = 6)	0.015 +/-0.006 (n = 6)
루시퍼라제를 암호화하는 플라스미드 pXL 2774(15 μ g)	7.33 +/-3.53 (n = 10)	491.71 +/- 122.28 (n = 10)

표 6: 전기장의 적용 존재 또는 부재하에, 각종 플라스미드가 주사된 근육에서 루시퍼라제 활성. 조건: 200 V/cm, 20 msec의 8 펄스, 진동수 1Hz. 근육당 백만단위 RLU의 루시퍼라제 활성의 평균값 +/- SEM.

결과는 루시퍼라제를 암호화하지 않는 플라스미드가 주사된 근육에서 기본 루시퍼라제 활성은 완전히 무시할 수 있음을 알 수 있다.

11.c - 각종 프로모터의 통제하에 유전자의 전기전달

전기장 적용의 존재 및 부재하에, 각종 프로모터의 영향력을 전달된 유전자의 발현 수준에서 시험한다.

근육당 주사된 플라스미드의 양은 2 μ g이다. 적용된 전기장은 1 Hz에서 20 msec의 8 펄스에서 200 V/cm 이고, 본 실험의 기타 조건은 실시예 1에 기재된 바와같다. 결과는 표 7에 나타나 있다. 시험된 플라스미드는 CMV-LUC 작제물의 경우 플라스미드 pXL3031이다. PGK 작제물은 pXL3031에서 PGK 프로모터로 CMV

프로모터의 대체물에 상응한다.

프로모터	PGK		CMV	
	-	+	-	+
RLU	8±2.8	1070±327	157±83	20350±1112
증폭 지수	x 133.7		x 129.3	

표 7: 근육당 백만단위 RLU의 루시퍼라제 활성의 평균값 +/- SEM.

이들 결과는 DNA가 전기장의 존재하에 전달될 때, 트랜스유전자의 발현 증가 계수가 프로모터의 기원 또는 길이에 상관없이 비교될 정도임을 보여준다.

11.d - 트랜스유전자에 의해 발현된 단백질을 어드레싱하는 각종 부위를 이용한 유전자 전달

본 실시예는 상이한 위치를 지닌 단백질을 암호화하는 유전자 전달을 설명한다. 플라스미드 pXL3031은 사이토솔에서 합성된 루시퍼라제를 암호화하고 플라스미드 pXL2774는 퍼록시솜에서 어드레싱된 루시퍼라제를 암호화한다.

근육당 주사된 플라스미드의 양은 10 µg이다. 적용된 전기장은 1 Hz에서 20 msec의 8 펄스에서 200 V/cm 이고, 본 실험의 기타 조건은 실시예 1에 기재된 바와같다. 결과는 표 8에 나타나 있다.

pXL2774		pXL3031	
전기전달	전기전달	전기전달	전기전달
-	+	-	+
11	1158	839	111524
±5	±238	±281	±16862

표 8: 백만 단위 RLU인 루시퍼라제 활성의 평균값 +/- SEM.

이들 결과는 본 발명에 따른 방법이 상이한 세포 위치를 지닌 단백질, 특히 퍼록시솜 단백질 또는 사이토솔 단백질을 암호화하는 유전자의 전달에 적용됨을 입증한다.

실시예 12: 트랜스유전자 발현의 동역학 및 조직 분석

12.a - 트랜스유전자 발현의 동역학

본 실시예는 본 발명에 따른 조건하에 전기장의 존재하에 핵산 전달이 적어도 4개월간 높고 안정한 수준의 트랜스유전자를 발현시킬 수 있음을 보여준다.

본 실험을 C57B1/6 마우스를 이용하여 수행한다. 사용된 플라스미드는 플라스미드 pXL2774이고, 투여된 DNA의 양은 15 µg이다. DNA 주사 후, 또는 주사없이(대조 그룹) 하기 조건하에 전기장을 적용한다: 강도 200 V/cm, 20 msec의 8 펄스, 진동수 1Hz. 본 실험의 기타 조건은 실시예 1에 기재된 바와같다. 루시퍼라제 활성은 다양한 시간대에 도살된 10 마우스 그룹에서 측정한다. 결과는 도 6에 나타나 있다.

대조 그룹의 경우, 루시퍼라제 발현은 플라스미드 주사후 3 시간째부터 검출될 수 있고 3일(D3)까지 증가된 다음 35일 이후에 현저히 감소됨이 관찰된다.

전기 펄스를 받은 그룹의 경우, 트랜스유전자의 발현은 대조 그룹의 것보다 매우 현저하게 높은 수준으로 유지된다. 또한, 놀라운 방법으로, 이 발현 수준은 35일 이상, 적어도 120일까지 높은 상태로 일정하게 유지됨이 관찰된다. 이렇게 높고 지속적인 트랜스유전자의 발현 수준은 치료 유전자를 이용한 장기 임상 치료 측면에서 볼때 특히 유리하다.

12.b - 조직 분석

핵산 국지화 β-갈락토시다제를 암호화하는 플라스미드 pCOR CMV-lacZ(pXL3004)를 투여하는 것을 제외한 동일한 조건하에 조직 연구를 수행한다.

플라스미드 pXL3004(도 13)은 핵 국지화 서열(nls)로 보충된 lacZ 유전자(Nouvel et al., 1994, Virology 204:180-189)가 플라스미드 pCDNA3(Invitrogen, 네덜란드)의 CMV 프로모터 및 SV40 바이러스 초기 영역(Genbank SV40G)의 폴리아데닐화 신호의 통제하에 도입되는 플라스미드 pXL2774(W097/10343)에서 유도된 벡터이다.

플라스미드 투여 후 7일째에 동물을 죽인다. 조직 분석은 β-갈락토시다제를 발현시키는 세포를 검출할 수 있고 핵은 구역의 평면에 위치한다(Xgal 조직화학).

조사된 구역 수준에서 양성 핵을 지닌 근섬유의 수는 대조 그룹(n=8)에서 평균 8.5에 비해(플라스미드 pXL3004를 수용하지만 전기 펄스를 받지 않은 동물), 평균적으로 플라스미드 pXL3004를 받아들이고 전기 펄스를 받은 그룹(n=8)에서 76이다.

트랜스유전자를 발현시키는 근섬유의 수는 대조 그룹과 비교해 평균적으로 9배 높은 것으로 밝혀졌다. 대부분의 이들 근섬유는 주변에 위치한 핵을 지니면서 정지되어있다. 매우 드문 중앙에 핵을지닌 근섬유는 β-갈락토시다제를 발현한다. 플라스미드의 주사경로와 함께, 표면 단위당 양성 근섬유의 밀도는 대조 그룹과 비교해 전기전달에 의해 처리된 그룹에서보다 큰 것이 관찰된다.

이들 결과는 대체로 전기장을 받지 않은 근육과 비교해 볼때, 전기전달이 트랜스유전자를 발현시키는 근섬유의 수를 매우 현저하게 증가시키고 트랜스유전자를 발현시키는 영역의 표면을 매우 뚜렷이 증가시킴

을 보여준다. 전기장의 적용은 주목할 만한 염증 반응을 야기하지 않음이 관찰된다.

실시에 13: 전기장 적용에 대한 핵산 주사 시간의 효과

본 실시예는 핵산이 전기장 적용 전 적어도 30분, 심지어 적어도 1시간째에 투여될 수 있다는 사실을 설명한다.

본 실험을 C57B1/6 마우스에서 수행한다. 사용된 플라스미드는 플라스미드 pXL2774이다. 투여된 DNA의 양은 15 μ g 또는 1.5 μ g이다. DNA를 주사한 다음, 또는 주사한 이후에, 하기 조건하에 전기장을 적용한다: 강도 200 V/cm, 20 msec의 8 펄스, 진동수 1Hz. 본 실험의 기타 조건은 실시예 1에 기재된 것과 같다. 대조 그룹은 전기 펄스가 가해지지 않은 것을 제외하고는 플라스미드의 주사를 받은 동물로 이루어진다. 결과는 표 9에 나타나 있다.

표 9A: 전기장의 부재하에 DNA의 주사

	실험 1 pXL2774 (15 μ g)	실험 2 pXL2774 (15 μ g)	실험 3 pXL2774 (15 μ g)	실험 4 pXL2774 (15 μ g)	실험 5 pXL2774 (15 μ g)
대조	7 \pm 4	8 \pm 6	0.4 \pm 0.2	22 \pm 15	1 \pm 1

표 9B: 전기장의 적용 전에 DNA의 주사

시간	실험 1	실험 2	실험 3	실험 4	실험 5
-120분				20 \pm 5	1 \pm 1
-60분				106 \pm 22	10 \pm 3
- 30분	303 \pm 36	237 \pm 61	7 \pm 3	184 \pm 22	15 \pm 4
- 5분	410 \pm 7				
- 60분	253 \pm 51				
- 20분	492 \pm 122	201 \pm 43	9 \pm 3	123 \pm 23	12 \pm 2

표 9C: 전기장 적용 후 DNA 주사

시간	실험 1	실험 2	실험 3	실험 4	실험 5
+10초				7 \pm 7	
+20초	11 \pm 6	0.4 \pm 0.1			
+60초	8 \pm 7			17 \pm 15	

표 9: 근육당 백만단위 RLU의 루시페라제 활성의 평균값 +/- SEM. N은 그룹당 10 근육이다.

전기장 적용 시점에서 DNA의 존재는 전기형질감염의 효율에 대한 조건이다. 놀랍게도, 플라스미드의 주사는 발현 수준의 뚜렷한 개질없이, 전기장 적용 전 적어도 30분 및 심지어 1시간(실험 4 및 5)째에 수행될 수 있음이 관찰된다. 유사한 결과가 근육당 플라스미드 15 μ g 및 1.5 μ g의 10배 낮은 양을 이용한 경우 모두에서 얻어진다.

이들 관찰 결과는 특히 다양한 시간대에, 전기장 적용 전의 근육중으로 동일 플라스미드, 또는 상이한 플라스미드의 수회 주사를 허용할 수 있다. 또한 광범위한 근육 영역에 걸쳐 수회 주사한 다음 치료될 주사 영역에 걸쳐 일련의 전기 펄스를 적용할 수도 있다.

실시에 14: 주사된 DNA의 양과 발현 수준간의 상관관계에 관한 통계적 연구

본 실시예에 나타난 통계적 연구는 전기장의 존재, 또는 부재에서 투여된 트랜스유전자 효과/양의 상관관계를 비교할 수 있다. 이 연구는 본 발명에 따른 방법이 트랜스유전자의 발현의 다양성을 상당히 감소시킴을 확인한다.

5주간 자란 C57B16 마우스의 뇌 경골근중으로 플라스미드 pXL3031을 양측면 주사한다. 플라스미드의 사용량은 DNA 0.25 내지 32 μ g으로 달라진다. 각 사용량을 10 동물에서 시험한다. 플라스미드를 주사한 후 즉시, 두 다리 중 하나에 20 msec의 4 펄스 및 1 Hz의 진동수로 250 V/cm의 장을 가한다.

동물을 치료 후 5일째에 죽이고 트랜스유전자 발현을 각 근육의 조직 추출물에서 평가한다. 결과는 도 7에 나타나 있다.

일련의 10회 각각에 대한 평균값의 함수에 따른 분산의 변화와 비교하면 트랜스유전자의 발현 분포가 log-정규임을 명확히 보여준다. 계산에 의해 확인된 도 7에서 결과의 그래프 분석은 발현이 주사된 DNA 사용량의 로그에 따라 직선적으로 달라짐을 보여준다.

Cochran 시험은 분산의 균일성은 각 회귀(전기전달의 존재 및 부재)의 경우에 존재하고, 이것이 모든 계산을 수행하는데 있어 나머지 분산을 이용할 수 있게 해줌을 보여준다.

선형성 편차 시험은 전기전달이 있는 경우에는 5% 위험도로 중요하지 않지만; 반면, 전기전달이 없는 경우에는 반응의 높은 비균일성을 반영하는 중요한 선형성 편차(p < 0.01)이다. 잔류 편차는 전기전달이 있는 경우 5배 낮다.

잔류 편차의 추정값을 고려해 볼때, 전기전달의 적용여부에 상관없이 형질감염 효율의 비교 시험에서 동일한 전력을 얻기위해 5배 적은 동물을 사용할 수 있다. 따라서, 신뢰 구간 P=95%의 경우, 2,5 또는 10 인자의 발현에서 차이를 입증하기 위해, 트랜스유전자가 전기전달에 의해 투여되면 각각 33, 8, 또는 5 동물이 필요할 것이고 전기전달이 없다면 각각 165, 40 또는 25 동물이 필요할 것이다. 전기전달이 사용된 경우 이러한 계산 타입을 하기 표에서 요약하고 있다.

효율 또는 발현비	P=95%	P=90%	P=85%	P=75%
2	33	28	24	19
5	8	7	6	6
10	5	5	4	4

따라서, 전기전달을 이용하여 얻어진 개개간 변화의 감소는 다양한 유전자의 발현과 비교시 정확한 분석 연구를 수행할 수 있다. 이는 또한 처리량을 보다 잘 규정할 수 있고 치료장에서 수용할 수 있는 양의 초과와 관련된 위험을 방지해야한다.

각 회귀의 경우에 얻어진 기울기 비교 시험은 중요하지 않다. 따라서 두 회귀사이에 평행인 5% 위험선에서 고려할 수 있다.

상대 전력의 계산은 전기전달의 존재하에 얻어진 것에 필적할 만한 발현 수준을 달성하기위해, 전기전달 부재하에서는 근육당 약 250배 이상으로 주사된 DNA가 필요함을 보여준다(243 +/- 85; 신뢰 구간 P=95%).

상대 전력의 계산은 주어진 양의 DNA의 경우, 발현 수준이 전기전달 부재하에 얻어진 발현 수준과 비교해서 전기전달 존재하에 약 500배 높음을 상관적으로 보여준다.

실시에 15: 각종 타입의 전극의 비교

본 실시예의 목적은 핵산 전달 효율에 대한, 두가지 타입의 전극, 플레이트 전극 및 바늘 전극의 효과를 비교하는데 있다. 바늘 전극은 각종 이식 배향에서도 시험된다.

플라스미드 pXL2774(150 µg)을 래트의 상두근에 주사한다. 플레이트 전극을 실시예 1에서 지시한 바와같이 배치한다. 플레이트 전극의 경우 전극간 거리는 1.2 cm이다. 바늘 전극의 경우, 전극간 거리는 0.9 cm이다. 바늘 전극을 주사 부위의 한쪽 측면에, 섬유 축에 수직 또는 평행하게, 동일한 길이로 근조직에 심는다. 전극의 타입, 또는 배향에 상관없이, 전기장 적용 조건은 하기와 같다: 강도 200 V/cm, 2 Hz에서 20 msec의 8 펄스. 결과는 도 8에 나타나 있다.

얻어진 결과는 근육에 이식된 두개의 평행한 바늘을 이용한 전기장 적용은 근육 주변 피부와 접촉하여 놓인 플레이트 전극을 이용하여 얻어진 것에 필적할 만한 결과를 제공함을 보여준다. 또한 전기전달 효율이 근섬유 축에 대해 바늘 전극이 심어진 방향과 무관함을 보여준다.

본 실시예는 본 발명에 따른 방법이 배향과 상관없이, 외부 또는 침입 전극을 이용하여 핵산의 전기전달을 가능케함을 보여준다. 바늘 전극의 사용은 중간-전압의 전기 펄스(예를 들면 200 V/cm의 전기장을 가하기 위해서는 0.5 cm의 간격으로 100 V)를 유지하면서 크기가 큰 근육으로 핵산을 전달하는데 있어 특히 유리하다.

실시에 16: 마우스, 래트, 토끼 및 원숭이의 각종 근육에 미치는 전기전달 효율

본 실시예는 각종 포유종(마우스, 토끼, 래트 및 원숭이)에서, 핵산의 전기전달이 각종 타입의 근육에 적용될 수 있음을 설명한다.

전기장 적용 조건은 각 종의 경우에 표 10A에서 규정하고 있다. 결과는 표 10A에 나타나 있다.

종	플라스미드	전기 펄스	뇌 경골근	비장근	넓적다리의 직장근	팔의 삼두 근	사두근
마우스	10 µg pXL3031	8 x 200 V/cm 20 msec, 2 Hz	x 28	x 196	x 342	x 1121	
래트	150 µg pXL3031	8 x 200 V/cm 20 msec, 2 Hz	x 31			x 160	x 13.2
토끼	200 µg pXL2774	4 x 200 V/cm 20 msec, 1 Hz	x 25417			x 724	x 3595

표 10A: 전기형질감염으로 얻어진 루시퍼라제 발현에서 증가 계수. 이 계수는 전기전달없이 플라스미드 pXL3031 또는 pXL2774의 주사의 경우에 얻어진 루시퍼라제 활성을 참조하여 계산된다. 그룹당 10 근육에 대한 평균값. 루시퍼라제 활성은 플라스미드 투여 후 7일째에 분석한다.

원숭이(마카카 파스시쿨라리스(*Macaca fascicularis*))에서도 전기전달 시험을 행하다. 사용된 플라스미드는 섬유아세포 성장 인자 1(FGF1 또는 aFGF)을 암호화하는 유전자를 포함한 플라스미드 pXL3179이다.

플라스미드 pXL3179(도 11)는 인간 섬유아세포 인터페론 신호 펩티드와 FGF1(섬유아세포 성장 인자1)(sp-FGF1, Jouanneau et al., 1991 PNAS 88:2893-2897)에 대한 cDNA간의 융합을 암호화하는 유전자가 인간 사이토메갈로바이러스 초기 영역(hCMV IE)에서 얻어진 프로모터 및 SV40 바이러스 후기 영역(Genbank SV4CG)의 폴리아데닐화 신호의 통제하에 도입된 플라스미드 pXL2774(W097/10343)에서 유도된 벡터이다.

FGF1의 존재는 면역조직화학에 의해 측정된다. 값은 플라스미드 pXL3179 500 μ g의 근육내 주사 후 3일째에 양성 구역의 수를 나타낸다. 전기장 적용 조건은 하기와 같다: 전기장 강도 200 V/cm, 1 Hz에서 20msec의 8 펄스. 결과는 하기 표에 나타나 있다.

	전기전달	
근육	-	+
삼두근	0	0
뇌 경골	0	30
이두근	0	4
사두근	0	30

표 10B: 면역조직화학에 의해, 각종 원숭이(마카카 파스시콜라리스)근에서 FGF1 발현의 입증. 값은 전기전달 존재 또는 부재하에서 FGF1을 암호화하는 플라스미드 pXL3179 500 μ g의 근육내 주사후 3일째 양성 구역의 수를 나타낸다.

이들 결과는 전기전달이 각종 포유류종의 각종 근육 타입에서 트랜스유전자의 발현을 뚜렷이 증가시킴을 입증한다.

실시에 17: 래트 격막근에 대한 전기전달 효율

격막 수준에서 직접 관련된 치료 유전자를 지속적이면서 안정하게 발현시킬 가능성은 이러한 근육의 기능에 영향을 미치는 퇴행성 질환, 특히 Duchenne 근질환의 치료적인 면에서 특히 유리한 치료법이다.

래트를 라르랙틸 및 케타민 혼합물(1 mg/kg 라르랙틸, 150 mg/kg 케타민)로 마취한다. 이들 실험에서, 격막은 흉골을 끼고 절개하기가 쉽다. 반격막으로 주사한다(20 mM NaCl 50 μ l 및 5% 글루코스중 플라스미드 pXL2774 50 μ g). 플레이트 전극을 주사 경로를 따라 격막 판의 한쪽 측면에 둔다(전극간 거리 = 1 mm). 전기전달 조건은 하기와 같다: 장 강도 160 V/cm 또는 300 V/cm, 20 msec의 8 펄스, 진동수 1 헤르쯔. 전기장을 주사 후 1분 이하로 적용한다. 동물을 깨낸다.

V/cm	0	160	300
총 RLU	48	920	51
	± 33	± 474	± 29

표 11: 근육당 백만 단위 RLU의 루시퍼라제 활성의 평균값 +/- SEM. N은 각 그룹당 12이다.

본 실시예는 전기장 강도 160 V/cm(Mann-Whitney 비-파라미터 시험의 경우 $p < 0.003$)를 지닌 20 msec의 8 펄스의 적용 후 격막에서 트랜스유전자의 발현이 상당히 개선됨을 보여준다.

실시에 18: 분비된 알칼라인 포스파타제(SeAP)를 암호화하는 유전자 전달 및 SeAP의 발현 동역학

본 실시예는 관련 치료 또는 백신의 폴리펩티드를 분비하는 기관으로 근육을 형질전환시키고 혈류에서 관련 폴리펩티드의 높고 안정한 농도의 존재를 보장하기 위한 본 발명에 따른 방법의 능력을 설명한다.

본 실시예에서, 인간 태반 분비 알칼라인 포스파타제를 암호화하는 유전자를 포함하는 플라스미드를 이용하여 성숙한 마우스에서 전기전달법을 시험한다. 성숙한 C57BL6 마우스의 뇌 경골근에 플라스미드 pXL3010을 단측면 주사한다.

플라스미드 pXL3010(도 13)는 pSEAP-basic(Clontech, Genbank: CVU09660)에서 얻어진 분비된 알칼라인 포스파타제를 암호화하는 유전자가 플라스미드 pCDNA3(Invitrogen, 네덜란드)에서 얻어진 CMV 프로모터 및 SV40 바이러스 후기 영역(Genbank SV4CG)의 폴리아데닐화 신호의 통제하에 도입된 CoIE1에서 유도된 벡터이다.

전기전달 조건은 하기와 같다: 전기장 200 V/cm, 20 msec의 8 펄스, 진동수 1 Hz. 전기장을 주사 20초 후에 적용한다. 혈액 샘플을 래트로오비탈 총의 수준에서 7일 후에 모은다. 혈청중의 알칼라인 포스파타제 농도를 화학루미네선스 시험(Phospha-light, Tropix, Bedford, MA 01730)에 의해 측정한다. 근육에 비암호 플라스미드(pUC19)를 주사한 후 또는 주사하기 이전에 전기장을 적용하는데, 이는 내인성 알칼라인 포스파타제 활성에 상응하는 신호의 부재를 입증할 수 있다. 결과는 표 12에 나타나 있다.

플라스미드	플라스미드 pUC19	전기전달	전기전달
pXL3010 μ g	μ g	-	+
0.1	0	0.03 \pm 0.01(n=5)	1.23 \pm 0.21(n=10)
0.3	0	0.05 \pm 0.02(n=5)	1.92 \pm 0.33(n=10)
1	0	0.16 \pm 0.04(n=5)	7.58 \pm 1.18(n=10)
10	0	1.52 \pm 0.59(n=10)	262.84 \pm 54.97(n=10)
400	0	15.64 \pm 10.77(n=5)	2203.11 \pm 332.34(n=5)
0.1	9.9	0.088 \pm 0.015(n=5)	21.39 \pm 3.54(n=10)
0.3	9.7	0.90 \pm 0.49(n=5)	95.67 \pm 16.15(n=10)
1	9	0.26 \pm 0.09(n=5)	201.68 \pm 32.38(n=10)
10	0	0.21 \pm 0.05(n=10)	357.84 \pm 77.02(n=10)

표 12: 혈청 ng/ml의 혈액중 순환 알칼라인 포스파타제(SeAP)의 평균값 \pm SEM.

플라스미드 pXL3010을 전기형질감염으로 투여할 때, 혈액 SeAP 농도에서 계수 140 또는 170 정도의 증가가 관찰된다.

400 μ g의 플라스미드를 주사(뇌 경골근에 100 μ g의 DNA를 양측면 주사, 전기장 적용 전 30분 간격으로 2회 적용)하면 전기전달 부재시 16 ng/ml인 반면 전기전달을 이용하면 2200 ng/ml의 알칼라인 포스파타제의 혈청 농도에 이를 수 있다.

일정한 양의 DNA(마우스당 총 DNA의 10 μ g)에서 작업이 가능한 비암호 DNA(pU1C9)의 첨가도 주사된 소량의 플라스미드 pXL3010(\leq 1 μ g)의 경우 알칼라인 포스파타제의 발현 수준을 개선할 수 있음을 주목해야 한다.

SeAP의 발현 동역학을 수행한다. 투여된 플라스미드의 양은 마우스 양측면당 15 μ g, 즉 마우스당 30 μ g이다. 결과는 도 9에 나타나 있다. 플라스미드 pXL3010을 전기전달에 의해 투여할 때 주사 후 7일째부터 혈액중에서 검출된 SeAP의 농도에서 크고 지속적인(적어도 2개월간) 증가가 관찰된다.

이들 결과 모두는 본 발명에 따른 방법에 의해 근육중으로 핵산 전달이 근육내에 위치한 단백질 및 분비된 단백질 모두의 경우에, 높고 지속적인 발현 수준을 얻을 수 있고 관련 폴리펩티드를 분비하는 기관으로 근육을 형질전환할 수 있음을 명확히 해준다.

실시예 19: 에리트로포이에틴(EPO)을 암호화하는 유전자의 전달

성인 C57B1/6 마우스의 뇌 경골근의 한쪽 측면에 플라스미드 pXL3348을 주사한다. 플라스미드 pXL3348(도 16)은 에리트로포이에틴에 대한 쥐 유전자(NCBI:193086)가 인간 사이토메갈로바이러스 초기 영역(hCMV 1E)에서 얻어진 프로모터 및 SV40 바이러스 후기 영역(Genbank SV4CG)의 폴리아데닐화 신호의 통제하에 도입된 플라스미드 pXL2774에서 유도된 벡터이다.

전기전달 조건은 하기와 같다: 전기장 강도 200 V/cm, 20 msec의 8 펄스, 진동수 1Hz. 전기장을 플라스미드 DNA 주사 후 즉시 적용한다.

	혈청 에리트로포이에틴 (mIU/ml), D7일째		혈청 에리트로포이에틴 (mIU/ml), D24일째	
	전기 전달, -	전기 전달, +	전기 전달, -	전기 전달, +
플라스미드				
pXL3348 (1 μ g)	0	3.0 \pm 1.6	0	1.12 \pm 0.8
pXL3348 (10 μ g)	0.9 \pm 0.9	61.8 \pm 15.8	0	74.1 \pm 28.9
pUC19 (1 μ g)		0		0
	헤마토크릿% D7일째에 샘플 수집		헤마토크릿% D24일째에 샘플 수집	
플라스미드	전기 전달, -	전기 전달, +	전기 전달, -	전기 전달, +
pXL3348 (1 μ g)	38.5 \pm 0.5	35.0 \pm 3.6	50.8 \pm 2.3	81 \pm 0.5
pXL3348 (10 μ g)	32.0 \pm 3.2	26.0 \pm 4.1	69.0 \pm 5.1	83.0 \pm 1.0
PUC19 (1 μ g)		30.8 \pm 2.3		43.2 \pm 0.9

표 13: 평균값 \pm SEM. N = 4-5.

전기 전달시, pXL3348 10 μ g의 투여의 경우 D7 및 D24일째에 혈액중의 에리트로포이에틴의 양이 매우 뚜렷한 증가가 관찰된다. 또한, 헤마토크릿을 증가시키는 에리트로포이에틴 증가의 생리적 효과는 매우 소량의 플라스미드(1 μ g)조차, D7일째부터, 매우 높다(85%).

실시예 20: 혈관 내피세포 성장 인자(VEGF)를 암호화하는 유전자 전달

성숙한 C57B16 또는 SCID 마우스의 뇌 경골근의 양측면에 pCOR hVEGF(pXL3212, 15 μ g)를 주사한다.

플라스미드 pXL3212(도 11)는 VEGF165(혈관 내피세포 성장인자, Genbank:HUMEGFAA)를 암호화하는 cDNA가 인간 사이토메갈로바이러스 초기 영역(hCMV 1E)에서 얻어진 프로모터 및 SV40 바이러스 후기 영역(Genbank SV4CG)의 폴리아데닐화 신호의 통제하에 도입되는 플라스미드 pXL2774(W097/10343)에서 유도된 벡터이다.

전기전달 조건은 하기와 같다: 전기장 강도 250 V/cm, 20 msec의 8 펄스, 진동수 2 Hz. 혈액 샘플을 레트로오비탈 총 수준으로 모은다. 샘플을 플라스미드 주사 전 하루, 및 주사 후 7일째 모은다. 인간 VEGF의 면역효소 분석을 Quantikine 키트(R&D System)를 이용하여 수행한다. 마우스 혈청에서 인간 VEGF를 이용하여 시험을 보정한다. 결과는 표 14에 나타나 있다.

마우스주	분석 일	전기 전달	인간 VEGF(ng/리터)
C57BL6	D-1	-	검출되지 않음
C57BL6	D+7	+	393 \pm 110
SCID	D-1	-	검출되지 않음
SCID	D+7	+	99 \pm 26

표 14: C57B16 및 SCID 마우스에서 혈청 VEGF 농도(ng/리터).

실시예 21: 인자 IX를 암호화하는 유전자 전달

성숙한 C57B16 또는 SCID 마우스의 뇌 경골근의 양측면에 pXL3388을 주사한다(15 μ g).

플라스미드 pXL3388(도 12)는 인간 인자 IX(Christmas 인자, Genbank:HUMFIXA)를 암호화하는 cDNA가 인간 사이토메갈로바이러스 초기 영역(hCMV IE, Genbank HS1EE)에서 얻어진 프로모터 및 SV40 바이러스 후기 영역(Genbank SV4CG)의 폴리아데닐화 신호의 통제하에 도입되는 플라스미드 pXL2774(W097/10343)에서 유도된 벡터이다.

전기전달 조건은 하기와 같다: 전기장 강도 250 V/cm, 20 msec의 8 펄스, 진동수 2 Hz. 혈액 샘플을 레트로오비탈 총 수준으로 모은다. 샘플을 플라스미드 주사 후 7일째 모은다. 결과는 표 15에 나타나 있다.

마우스주	주사	전기전달	인간 인자 IX(μ g/L)
C57BL/6	pXL3388	+	69 \pm 12
C57BL/6	pXL3388	-	검출되지 않음
C57BL/6	NaCl 0.9%	+	검출되지 않음
SCID	pXL3388	+	66 \pm 5
SCID	pXL3388	-	검출되지 않음

표 15: C57B16 및 SCID 마우스에서 인자 IX의 혈장 농도.

인간 인자 IX는 플라스미드가 본 발명에 따른 방법의 조건하에 투여될 때에만 혈액에서 검출될 수 있다.

실시예 22: 섬유아세포 성장 인자 1(FGF1)을 암호화하는 유전자 전달

성숙한 C57BL6 또는 SCID 마우스의 뇌 경골근의 양측면에 pCOR FGF1(pXL3096, 15 μ g)을 주사한다.

플라스미드 pXL3096(도 14)은 인간 섬유아세포 인터페론 신호 펩티드 및 FGF1(섬유아세포 성장 인자 1)(sp-FGF1, Jouanneau et al., PNAS 88:2893-2897)에 대한 cDNA간의 융합을 암호화하는 유전자가 인간 사이토메갈로바이러스 초기 영역(hCMV IE)에서 얻어진 프로모터 다음의 HSV1 TK 유전자의 선도 서열(전사, 비전사) 및 SV40 바이러스 후기 영역(Genbank SV4CG)의 폴리아데닐화 신호의 통제하에 도입되는 삼중 나선(TH, Wils et al., 1997. Gene Ther 4: 323-330)을 형성할 수 있는 서열과 상보적인 플라스미드 pXL2774(W097/10343)에서 유도된 벡터이다.

전기전달 조건은 하기와 같다: 전기장 강도 200 V/cm, 20 msec의 8 펄스, 진동수 2 Hz. FGF1의 존재는 면역조직화학법에 의해 드러난다.

C57BL6 마우스의 결과는 도 10에 나타나 있다. 양성 섬유아의 수는 대조 그룹(pXL3096은 주사되지만 전기장이 가해지지 않음)과 비교해서 전기장이 가해진 그룹의 경우에 매우 상당히 높음이 관찰된다. 대조 그룹의 경우 FGF1의 존재는 D21 및 D35일째에 실제로 검출될 수 없지만 다수의 양성 섬유아는 전기전달에 의해 처리된 그룹의 경우에 관찰가능하다.

SCID 마우스의 결과는 표 16에 나타나 있다.

	전기전달	좌측 뇌 경골	우측 뇌 경골
pXL 3096(15 μ g)	+	600	450
pXL 3096(15 μ g)	+	700	300
	-	3	0
	-	3	0
	-	0	0
pXL 3096(1.5 μ g)	+	80	70
pXL 3096(1.5 μ g)	+	20	35
	+	110	100
	-	0	0
	-	0	1

표 16: FGF의 발현, 면역조직화학 연구 및 근육 중간 부위에서 취해진 근육 구역상의 양성 섬유아의 수

면역조직화학에 의해 드러난 양성 섬유아의 수를 측정하면, FGF1의 발현은 전기장을 받은 근육에서만 검출된다. FGF1의 발현이 투여된 낮은 수준의 플라스미드(1.5 μ g)의 경우에서도 검출됨을 주목해야 한다.

실시예 23: 신경 친화성 인자 NT3를 암호화하는 유전자 전달

본 발명에 따른 방법을 뉴로트로핀 3(NT3)를 암호화하는 유전자를 전달하는 성숙한 마우스(C57B16) 및 어린 마우스 Xt/pm μ 에 적용한다. pm μ 마우스는 모토뉴런의 미성숙 및 빠른 퇴행과 약 40일의 평균 수명이 특징인 아밀로트로픽 측면 경화증(ALS)의 쥐 모델을 구성한다.

23.1 - 성숙한 마우스 중으로 NT3를 암호화하는 유전자 전달

5주간 자란 C57B1/6 마우스의 뇌 경골근의 한쪽 측면에 쥐 뉴로트로핀 3(NT-3)를 암호화하는 유전자를 포함하는 플라스미드 pXL3149(12.5 μ g)를 주사한다.

플라스미드 pXL3149(도 14)는 쥐 뉴로트로핀 3(NT-3)(Genbank MMNT3)를 암호화하는 유전자가 인간 사이토메갈로바이러스 초기 영역(hCMV IE)에서 얻어진 프로모터 및 SV40 바이러스 후기 영역(Genbank SV40CG)의 폴리아데닐화 신호의 통제하에 도입된 플라스미드 pXL2774(W097/10343)에서 유도된 벡터이다.

전기전달 조건은 하기와 같다: 전기장 강도 250 V/cm, 20 msec의 4 펄스, 진동수 1 Hz. 전기장을 플라스미드 DNA를 주사한 후 즉시 적용한다. 마우스를 처리한 후 7일째 PBS 완충액중의 그라운드 근육 산물의 12000 g 상등액에서 NT3의 존재를 평가한다. NT3의 양을 ELISA 분석(Promega 키트)으로 측정한다.

20 근육에서 평균값(\pm 95% 신뢰구간)은 75+/- 11 pg/근육(전기전달없이 투여된 플라스미드 DNA) 및 2700 +/- 900 pg/근육(전기전달로 투여된 플라스미드 DNA)이다.

플라스미드 pXL3149를 본 발명에 따른 방법의 조건하에 전달할 경우 근육에서 생성된 NT3의 양이 계수 55로 증가함이 관찰된다.

23.2 - 어린 마우스 중으로 NT3를 암호화하는 유전자 전달

플라스미드 pXL3149를 이용하여 4 내지 5일간 자란 이형 접합 Xt pmn 마우스에서 비교 실험을 수행한다. 주사된 양은 동물당 130 μ g이고 동물의 각종 근육(비장근 25 μ g, 뇌 경골 12.5 μ g)중으로 복수부위 기준으로 주사를 행한다.

전기전달 조건은 하기와 같다: 전기장 강도 500 V/cm, 20 msec의 4 펄스, 진동수 1 Hz.

혈장 및 근육(비장근 또는 뇌 경골)에 플라스미드를 투여한 후 7일째에 NT3의 존재를 평가한다. 0.9% NaCl 용액을 투여하여 NT3의 기본 수준인 대조를 얻는다. NT3의 양을 ELISA 분석으로 측정한다(Promega 키트). 결과는 표 17에 나타나 있다.

	NaCl 0.9%		pXL3149	
	-	+	-	+
전기전달				
혈장	0 (n=2)	0(n=2)	46 \pm 10(n=4)	1599 \pm 639(n=4)
비장근	3619 \pm 102(n=4)	1619 \pm 150(n=2)	3649 \pm 1078(n=8)	19754 \pm 3818(n=8)
뇌 경골근	1415 \pm 363(n=4)	1453 \pm 375(n=2)	1400 \pm 155(n=8)	16826 \pm 3135(n=8)

표 17: NT3 양의 평균값 \pm SEM(pg/근육 및 pg/혈장 ml).

본 실험 조건하에 비장근 및 뇌 경골근에서 기본적인 수준의 NT3 검출 신호가 관찰된다. 전기전달 없이, 플라스미드 pXL3149의 주사로 얻어진 NT3 유전자의 발현 수준은 근육에서 기본적인 수준의 NT3 검출보다 높지 않다. 플라스미드가 본 발명에 따른 방법으로 투여시, 근육에서 검출된 NT3의 양은 매우 상당히 증가됨이 관찰된다. 근육에 의해 분비되고 혈장에서 검출된 NT3의 양은 이들 조건하에 매우 뚜렷이(계수 35배 증가)이 증가됨이 관찰된다.

이들 결과는 주어진 양의 DNA의 경우, 본 발명에 따른 방법이 DNA의 전달 효율을 매우 상당한 정도로 증가시키고 근육에서뿐만 아니라, 혈장에서 NT3와 같은 뉴트로핀의 양을 다량 증가시킬 수 있음을 보인다.

실시에 24: 인간 성장 호르몬을 암호화하는 유전자 전달

C57B1/6의 뇌 경골근의 한쪽 측면에 플라스미드 pXL3353(10 μ g) 또는 플라스미드 pXL3354(10 μ g)를 주사한다. 플라스미드 pXL3353(도 15)은 인간 성장 호르몬(전사 초기 신호에서 확장한 hGH Xgal/SphI 단편, BamH1 부위, 폴리 A 부위 이후의 224 bp 이하)의 전체 유전자가 인간 사이토메갈로바이러스 초기 영역(hCMV IE)에서 얻어진 프로모터 및 SV40 바이러스 후기 영역의 폴리아데닐화 신호의 통제하에 도입되는 플라스미드 pXL2774에서 유도된 벡터이다.

인간 성장 호르몬 유전자의 cDNA는 인간 뇌하수체의 폴리(A+) mRNA 라이브러리의 역전사에 이은 하기 올리고뉴클레오티드를 이용한 30 PCR 증폭 사이클에 의해 얻어진다:

5'-영역에 상보적인 올리고뉴클레오티드:

5'-GGGTCTAGAGCCACCATGGCTACAGGCTCCCGAC-3'

이 올리고뉴클레오티드는 XbaI 부위 및 코작 서열을 함유한다.

3'-영역에 상보적인 올리고뉴클레오티드:

5'-GGGATGCATTTACTAGAAGCCACAGCTGCCTC-3'

이 올리고뉴클레오티드는 NsiI 부위 및 종결 코돈을 함유한다.

증폭된 단편을 플라스미드 pCR2.1(TA 클로닝 키트, inbitrogen)에 도입하고 서열분석한다. hGH의 cDNA를 함유하는 681 bp의 XbaI/NsiI 단편을 pXL3353의 XbaI/NsiI 단편으로 연결시켜 플라스미드 pXL3354(도 15)를 생성한다.

전기전달 조건은 하기와 같다: 전기장 강도 200 V/cm, 20 msec의 8 펄스, 진동수 1Hz. 전기장을 플라스미드 DNA를 주사한 후 즉시 적용한다. hGH의 존재를 마우스를 처리한지 7일 후에, 12 000 g으로 원심분리된 PBS 완충액중의 그라운드 근육 산물의 상등액에서 평가한다. hGH의 양을 ELISA 분석(Boehringer Mannheim)으로 측정한다.

	게노믹 hGH 주사(pXL3353)		hGH cDNA 주사 (pXL3354)	
	-	+	-	+
뇌 경골근	87.1±9.3 (n=10)	1477.6±67.6 (n=10)	2820.0±487.5 (n=10)	15739.1±915.5 (n=10)

표 18: hGH 단백질(피코그램)/근육의 평균값 ± SEM.

이들 결과는 전기전달이 인간 성장 호르몬에서 매우 큰 증가를 얻을 수 있음을 보여준다. 이러한 증폭이 모든 조절 서열을 지닌 전체 유전자를 함유하는 플라스미드를 이용하여 관찰됨도 주목해야 한다.

실시에 25: 백신 트랜스유전자의 발현에 미치는 전기전달 효과

본 실시예는 본 발명에 따른 방법이 관련 백신 폴리펩티드를 암호화하는 유전자의 전달에도 적용될 수 있음을 입증한다.

9주간 자란 암컷 Balb/c 마우스에서 실험을 수행한다. 사용된 전극은 5 mm 떨어진 스테인레스강 플레이트 전극이다. VR-HA는 인플루엔자 바이러스(균주 A/PR/8/34)의 헤마글루티닌 유전자를 함유한 플라스미드 DNA이다. VR-gB는 인간 사이토메갈로바이러스(Towne 균주)의 글리코프로테인 B(gB)에 대한 유전자를 함유한 플라스미드 DNA이다.

플라스미드 용액(0.9% NaCl중 20 µg/ml 또는 200 µ/ml 용액중 50 µl)을 피부를 통해 뇌 경골근의 한쪽 측면으로 세로로 주사한다. 플라스미드를 투여한 지 20초 후에, 구형 펄스 제너레이터(전기장 강도 200 V/cm, 20 msec의 지속시간의 8 연속 펄스, 진동수 1Hz)를 이용하여 근육 축에 수직으로 전기 펄스를 적용한다.

면역 반응의 자극을 평가하기 위해, 하기 면역 프로토콜을 따른다:

- D 0 예비면역 혈청 수집
- D 1 1차 주사, +/- 전기전달
- D 2 면역 혈청 수집
- D 2 부스터 주사, +/- 전기전달
- D 42 면역 혈청 수집
- D 63 면역 혈청 수집

혈액 샘플을 레트로오비탈 시누스 수준으로 수집한다. 특정 항체 분석을 ELISA로 수행한다. 각 실험 조건을 한쪽 측면으로 주사된 10 동물에서 시험한다.

인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌으로 향하는 항체의 역가와 관련된 결과는 표 19a에 나타나 있다.

	전기전달	D0	D21	D42	D63
VR-HA (1 µg)	-	<50	132±739	1201±4380	1314±2481
VR-HA (1 µg) (p)	+	<50	1121±1237 (0.0135)	10441±7819 (0.0022)	8121±5619 (0.0033)
VR-HA(10 µG)	-	<50	781±666	5113±16015	4673±8238
VR-HA(10 µG) (p)	+	<50	4153±2344 (0.0002)	74761±89228 (0.0005)	41765±52361 (0.0007)

표 19-a: 전기 펄스의 부재 또는 존재하에 1 또는 10 µg의 DNA(VR-HA)를 주사한 후 얻어진, 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌으로 향하는 항체의 역가. 결과는 10 동물(전기 펄스의 존재하에 DNA 1 µg이 주사된 그룹에 대한 8 동물 및 D63일째 수집된 샘플)에 대한 기하 평균 ± 표준 편차이다. p값은 Man-Whitney 비파라미터 시험을 이용하여 전기 펄스의 존재 및 부재하에 주사된 그룹과 쌍으로 비교하여 얻어진다.

이들 결과는 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌으로 향하는 항체의 역가가 전기 펄스를 받은 그룹에서 계수 약 10으로 증가됨을 보여준다. 따라서, 전기 펄스의 존재하에 DNA 1 µg을 받은 마우스는 전기 펄스의 부재하에 DNA 10 µg을 받은 마우스의 것보다 약간 큰 평균 항체 역가를 가진다.

인간 사이토메갈로바이러스 글리코프로테인 B로 향하는 항체의 역가와 관련된 결과는 표 19b에 나타나 있다.

	전기전달	D0	D21	D42	D63
VR-gB(10 µg)	-	<50	73±138	755±1766	809±1363
VR-gB(10 µg) (p)	+	<50	200±119 (0.0558)	3057±1747 (0.0108)	2112±1330 (0.0479)

표 19b: 전기 펄스의 부재 또는 존재하에 10 µg의 DNA(VR-gB)를 주사한 후 얻어진, 인간 사이토메갈로바

이러스 글리코프로테인 B(gB)를 향하는 항체의 역가. 결과는 10 동물(전기 펄스의 존재하에 주사된 그룹에 대한 9 동물)의 기하 평균 \pm 표준 편차이다. p의 값은 Man-Whitney 비파라미터 시험을 이용하여 전기 펄스의 존재 및 부재하에 주사된 그룹과 쌍으로 비교해 얻어진다.

이들 결과는 인간 사이토메갈로바이러스 글리코프로테인 B로 향하는 항체의 역가가 전기 펄스를 받은 그룹에서, D42일 째에 계수 4로 증가됨을 보여준다. 또한 변화의 계수는 전기 펄스를 받는 동물 그룹에서 평균적으로 3배정도 낮음을 알 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

근육 세포가 조직으로 직접 투여 또는 국부 또는 전신 투여에 의해 형질감염될 핵산과 접촉하고 근육에 1 내지 800 볼트/cm 강도의 전기 펄스를 1회 이상 적용하여 전달이 이루어지는 생체내 하나 이상의 횡문근 중으로 핵산을 전달하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 전기장 강도가 4 내지 400 볼트/cm임을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 전기장 강도가 30 내지 300 볼트/cm임을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 전기장 적용의 총 지속시간이 10 밀리초 이상임을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 근육으로 전기장의 적용이 규칙적인 진동수의 펄스를 1회 이상 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 근육으로 전기장의 적용이 0.1 내지 1000 헤르쯔의 진동수의 1 내지 100,000 펄스를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 전기 펄스가 서로에 대해 불규칙적인 방법으로 통하고 1회 펄스의 경우 시간의 함수에 따른 전기장의 강도를 기술하는 함수가 가변적임을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 시간에 따른 전기장 변화를 기술하는 함수의 적분이 1 kVxmsec/cm 이상임을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 이 적분이 5 kVxmsec/cm 이상이거나 이와 동일함을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 전기 펄스가 구형파 펄스, 전기장 생성 지수적 감소파, 한정된 지속시간의 진동 단극성 파, 한정된 지속시간의 진동 양극성 파, 또는 기타 파장 형태 중에서 선택됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 전기 펄스가 구형파 펄스를 포함함을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 전기 펄스가 근육의 한쪽 측면에 놓이거나 피부와 접촉하여 놓인 전극을 사용하여 적용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 전기 펄스가 근육의 안쪽에 도입된 전극을 이용하여 적용됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 근육에 주사됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 전신 경로로 주사됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 핵산이 동맥내 또는 정맥내 경로로 주사됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 국부, 피부, 경구, 질, 비내, 피하 또는 안내 경로로 투여됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 추가로 상이한 투여 방식을 위해 약학적으로 허용가능한 부형제를 함유한 조성물에 존재함을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 비경구 투여에 적당한 조성물.

청구항 20

제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 데옥시리보핵산임을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 리보핵산임을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 합성 또는 생합성 기원이거나, 바이러스 또는 단세포 또는 다세포 진핵 또는 원핵 생물에서 추출됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 투여된 핵산이 기원 생물 성분 및/또는 합성 시스템 전부 또는 일부와 결합됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 관련 RNA 또는 단백질을 암호화 함을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 24 항에 있어서, RNA가 촉매 또는 안티센스 RNA임을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 24 항에 있어서, 핵산이 효소, 혈액 유도체, 호르몬, 림포카인, 성장 인자, 트로픽 인자, 안기오게닉 인자, 신경친화성 인자, 골격 성장 인자, 조혈 인자, 응고 인자, 항원 및 아미노산, 지질 및 세포의 기타 필수 요소의 대사와 관련된 단백질 중에서 선택된 단백질을 암호화 함을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제 26 항에 있어서, 핵산이 안기오게닉 인자 VEGF 및 FGF, 신경 친화성 인자 BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, FGF1, NT3, NT5, Gax 단백질, 당뇨병 치료용 인슐린, 성장 호르몬, 사이토킨, α -1-안티트립신, 칼시토닌, 렙틴 및 아포리포프로테인, 비타민 생합성 효소, 호르몬 및 신경매개체를 암호화함을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제 24 항에 있어서, 핵산이 항체, 단일-쇄 항체의 다양한 단편(ScFv) 또는 면역요법을 위해 인식 능력을 소유하는 기타 항체 단편을 암호화하거나, 가용성 수용체, 수용체 또는 부착 단백질의 아고니스트 또는 길항제인 펩티드, 인공, 키메라 또는 끝잘린 단백질을 암호화함을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제 28 항에 있어서, 핵산이 안티이디오타입 항체, CD4 수용체 또는 TNF α 수용체 또는 아세틸콜린 수용체의 가용성 단편을 암호화함을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제 26 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 치료 단백질의 전구체를 암호화함을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제 1 항 내지 제 30 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 플라스미드 형태임을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제 1 항 내지 제 30 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 큰 크기의 유전자 및/또는 인트론 및/또는 작거나 큰 크기의 조절 요소를 함유함을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제 1 항 내지 제 30 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 에피솜 DNA 또는 효모 인공 염색체 또는 미니염색체임을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제 1 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 근육에서 트랜스유전자를 발현시키고/발현시키거나 촉진하는 서열을 함유함을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제 1 항 내지 제 34 항 중 어느 한 항에 있어서, 산이 벡터 타입과 결합되거나, 바이러스, 합성 또는 생합성 제제, 또는 추진되거나 추진되지 않는 비드와 같이, 핵산 전달을 개선할 수 있는 벡터 콤비네이션과 결합됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제 1 항 내지 제 35 항 중 어느 한 항에 있어서, 근육이 유전자 전달을 개선하기 위한 처리, 국부 또는 전신 적용 형태로 억제성 처리, 또는 효소적, 투과적, 외과적, 기계적, 열적 또는 물리적 처리가 이루어짐을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제 1 항 내지 제 36 항 중 어느 한 항에 있어서, 근육이 근육 세포 또는 분비 세포에서, 생리적 및/또는 치료적인 양의 제제를 생성할 수 있음을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제 1 항 내지 제 37 항 중 어느 한 항에 있어서, 형질감염되는 근육 조직의 범위를 조절하여 발현되는 트랜스유전자의 양을 조절할 수 있음을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제 38 항에 있어서, 다수의 투여 부위를 사용하여 형질감염되는 근육 조직 범위를 조절할 수 있음을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제 1 항 내지 제 39 항 중 어느 한 항에 있어서, 전극의 수, 형상, 표면 및 배열을 조절하고, 펄스의 전기장 강도, 횡수, 지속시간, 진동수 및 형태, 및 투여되는 핵산의 양과 용적을 변화시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제 1 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항에 있어서, 국부 전기 펄스를 받은 범위의 조직에 의해 형질감염된 조직의 국지화를 억제할 수 있음을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

제 1 항 내지 제 41 항 중 어느 한 항에 있어서, 형질감염된 조직 영역을 제거시켜 초기 위치로 되돌아감을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

핵산과 1 내지 800 볼트/cm 강도의 전기장인, 생체내 황문근으로 동시, 따로 또는 일정한 간격으로 투여되고 황문근으로 생체내 전기형질감염에 기초한 유전자 요법을 위한 콤비네이션 산물.

청구항 44

제 43 항에 있어서, 전기장 강도가 4 내지 400 볼트/cm임을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 45

제 43 항에 있어서, 전기장 강도가 30 내지 300 볼트/cm임을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 46

제 43 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항에 있어서, 전기장 적용의 총 지속시간이 10 밀리초 이상임을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 47

제 43 내지 제 46 항 중 어느 한 항에 있어서, 근육으로의 전기장 적용이 1회 이상의 규칙적인 진동수의 펄스를 포함함을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 48

제 47 항에 있어서, 근육으로의 전기장의 적용이 0.1 내지 1000 헤르쯔의 진동수의 1 내지 100,000 펄스를 포함함을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 49

제 43 항 내지 제 46 항 중 어느 한 항에 있어서, 전기 펄스가 서로에 대해 불규칙적인 방법으로 전달되고 1회 펄스의 경우 시간의 함수에 따른 전기장의 강도를 기술하는 함수가 가변적임을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 50

제 43 항 내지 제 49 항 중 어느 한 항에 있어서, 시간에 따른 전기장 변화를 기술하는 함수의 적분이 1 kVxmsec/cm 이상임을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 51

제 50 항에 있어서, 이 적분이 5 kVxmsec/cm 이상이거나 이와 동일함을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 52

제 43 항 내지 제 51 항 중 어느 한 항에 있어서, 전기 펄스가 구형파 펄스, 전기장 생성 지수적 감소파, 한정된 지속시간의 진동 단극성 파, 한정된 지속시간의 진동 양극성 파, 또는 기타 파장 형태 중에서 선택됨을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 53

제 43 항 내지 제 52 항 중 어느 한 항에 있어서, 전기 펄스가 구형파 펄스를 포함함을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 54

제 43 항 내지 제 53 항 중 어느 한 항에 있어서, 전기 펄스가 근육의 한쪽 측면에 놓이거나 피부와 접촉하여 놓인 전극을 이용하여 적용됨을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 55

제 43 항 내지 제 53 항 중 어느 한 항에 있어서, 전기 펄스가 근육의 내부로 적용됨을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 56

제 43 항 내지 제 55 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 근육에 주사됨을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 57

제 43 항 내지 제 55 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 전신 경로로 주사됨을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 58

제 57 항에 있어서, 핵산이 동맥내 또는 정맥내 경로로 주사됨을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 59

제 43 항 내지 제 55 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 국부, 피부, 경구, 질, 비내, 피하 또는 안내 경로로 투여됨을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 60

제 43 항 내지 제 59 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 추가로 상이한 투여 방식을 위해 약학적으로 허용가능한 부형제를 함유한 조성물에 존재함을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 61

제 60 항에 있어서, 비경구 투여에 적당한 조성물.

청구항 62

제 43 항 내지 제 61 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 데옥시리보핵산임을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 63

제 43 항 내지 제 61 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 리보핵산임을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 64

제 43 항 내지 제 63 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 합성 또는 생합성 기원이거나, 바이러스 또는 단세포 또는 다세포 진핵 또는 원핵 생물에서 추출됨을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 65

제 64 항에 있어서, 투여된 핵산이 기원 생물 성분 및/또는 합성 시스템 전부 또는 일부와 결합됨을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 66

제 43 항 내지 제 65 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 관련 RNA 또는 단백질을 암호화함을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 67

제 66 항에 있어서, RNA가 촉매 또는 안티센스 RNA임을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 68

제 66 항에 있어서, 핵산이 효소, 혈액 유도체, 호르몬, 림포카인, 사이토킨, 성장 인자, 트로픽 인자, 안기오게닉 인자, 신경친화성 인자, 골격 성장 인자, 조혈 인자, 응고 인자, 항원 및, 아미노산, 지질 및 세포의 기타 필수 요소의 대사와 관련된 단백질 중에서 선택된 단백질을 암호화함을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 69

제 68 항에 있어서, 핵산이 안기오게닉 인자 VEGF 및 FGF, 신경 친화성 인자 BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, FGF1, NT3, NT5, Gax 단백질, 당뇨병 치료용 인슐린, 성장 호르몬, α -1-안티트립신, 칼시토닌, 렙틴 및 아포리포프로테인, 비타민 생합성 효소, 호르몬 및 신경매개체를 암호화함을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 70

제 66 항에 있어서, 핵산이 항체, 단일-쇄 항체의 다양한 단편(ScFv) 또는 면역요법을 위해 인식 능력을 소유하는 기타 항체 단편을 암호화하거나, 가용성 수용체, 수용체 또는 부착 단백질의 아고니스트 또는 길항제인 펩티드, 인공, 키메릭 또는 결합된 단백질을 암호화함을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 71

제 70 항에 있어서, 핵산이 안티이디오타입 항체, CD4 수용체 또는 TNF α 수용체 또는 아세틸콜린 수용체의 가용성 단편을 암호화함을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 72

제 68 항 내지 제 71 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 치료 단백질의 전구체를 암호화함을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 73

제 43 항 내지 제 72 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 플라스미드 형태임을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 74

제 43 항 내지 제 72 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 큰 크기의 유전자 및/또는 인트론 및/또는 작거나 큰 크기의 조절 요소를 함유함을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 75

제 43 항 내지 제 72 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 에피솜 DNA 또는 효모 또는 박테리아 인공 염색체 또는 미니염색체임을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 76

제 43 항 내지 제 75 항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 근육에서 트랜스유전자를 발현시키고/발현시키거나 촉진하는 서열을 함유함을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 77

제 43 항 내지 제 76 항 중 어느 한 항에 있어서, 산이 벡터 타입과 결합되거나, 바이러스, 합성 또는 생합성 제제, 또는 추진되거나 추진되지 않는 비드와 같이, 핵산 전달을 개선할 수 있는 벡터 콤비네이션과 결합됨을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 78

제 43 항 내지 제 77 항 중 어느 한 항에 있어서, 근육이 유전자 전달을 개선하기위한 처리, 국부 또는 전신 적용 형태로 약제성 처리, 또는 효소적, 투과적, 외과적, 기계적, 열적 또는 물리적 처리가 이루어

짐을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 79

제 43 항 내지 제 78 항 중 어느 한 항에 있어서, 근육이 근육 세포 또는 분비 세포에서, 생리적 및/또는 치료적인 양의 제제를 생성할 수 있음을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 80

제 43 항 내지 제 78 항 중 어느 한 항에 있어서, 형질감염되는 근육 조직의 범위를 조절하여 발현되는 트랜스유전자의 양을 조절할 수 있음을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 81

제 80 항에 있어서, 다수의 투여 부위를 사용하여 형질감염되는 근육 조직의 범위를 조절할 수 있음을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 82

제 43 항 내지 제 81 항 중 어느 한 항에 있어서, 전극의 수, 형상, 표면 및 배열을 조절하고, 펄스의 전기장 강도, 횡수, 지속시간, 진동수 및 형태, 및 투여되는 핵산의 양과 용적을 변화시킬 수 있음을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 83

제 43 항 내지 제 82 항 중 어느 한 항에 있어서, 국부 전기 펄스를 받은 범위의 조직에 의해 형질감염된 조직의 국지화를 억제할 수 있음을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

청구항 84

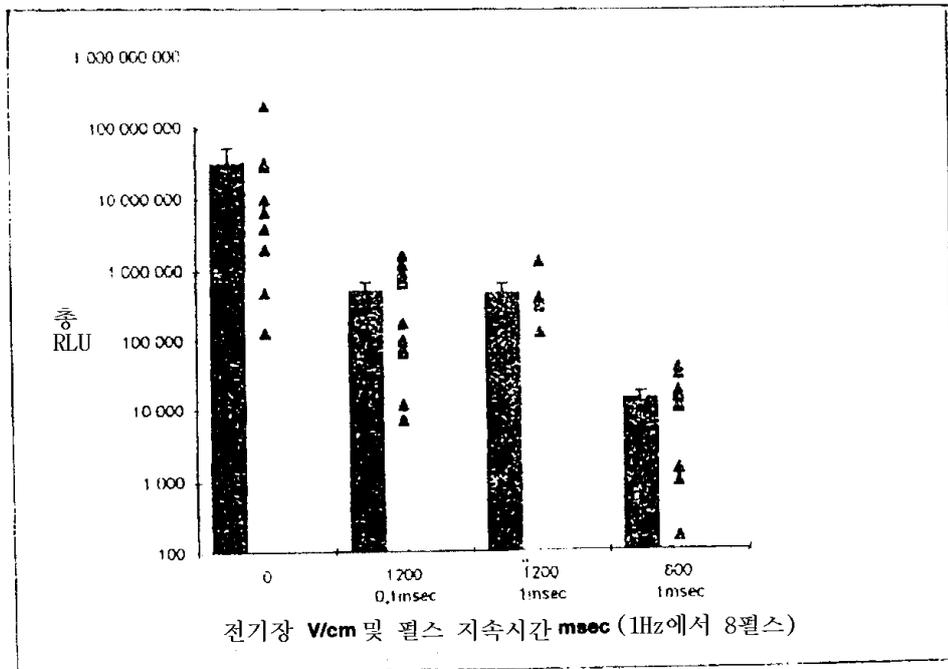
제 43 항 내지 제 83 항 중 어느 한 항에 있어서, 형질감염된 조직 영역을 제거시켜 초기 위치로 되돌아감을 특징으로 하는 콤비네이션 산물.

도면

도면 1a

도 1 : 마우스에서 뇌 경골근중으로 DNA pXI 2774의 형질감염에 대한 높은 전기장 강도의 전기 펄스 효과. 평균값 ± SEM

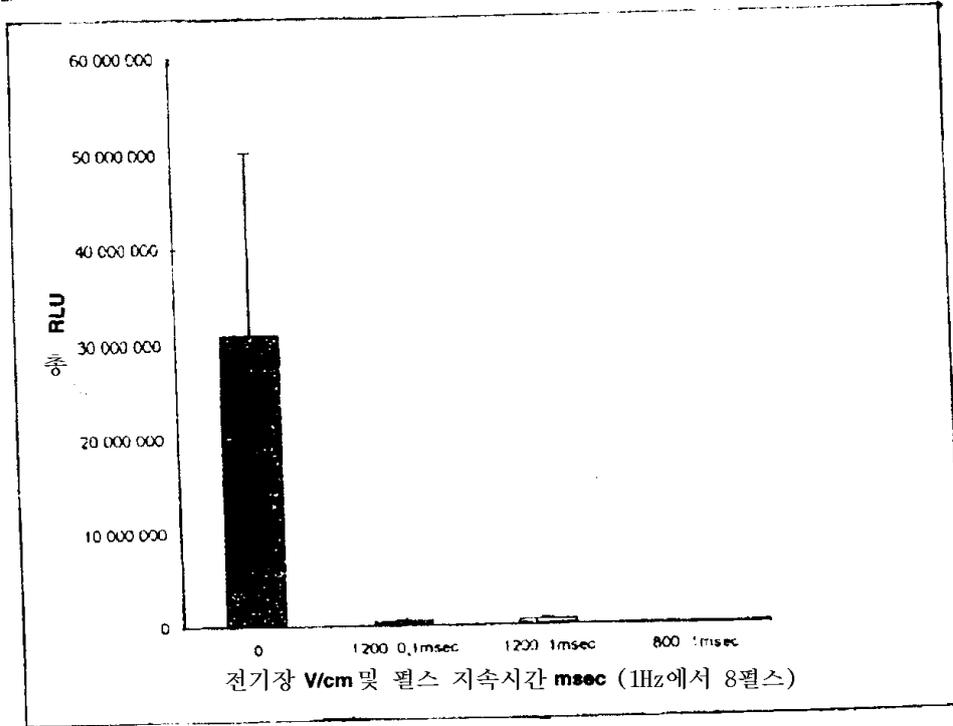
A 로그 스케일



도면 1b

도 1 : 마우스에서 뇌 경골근중으로 DNA pXI 2774의 형질감염에 대한 높은 전기장 강도의 전기 펄스 효과. 평균값 \pm SEM

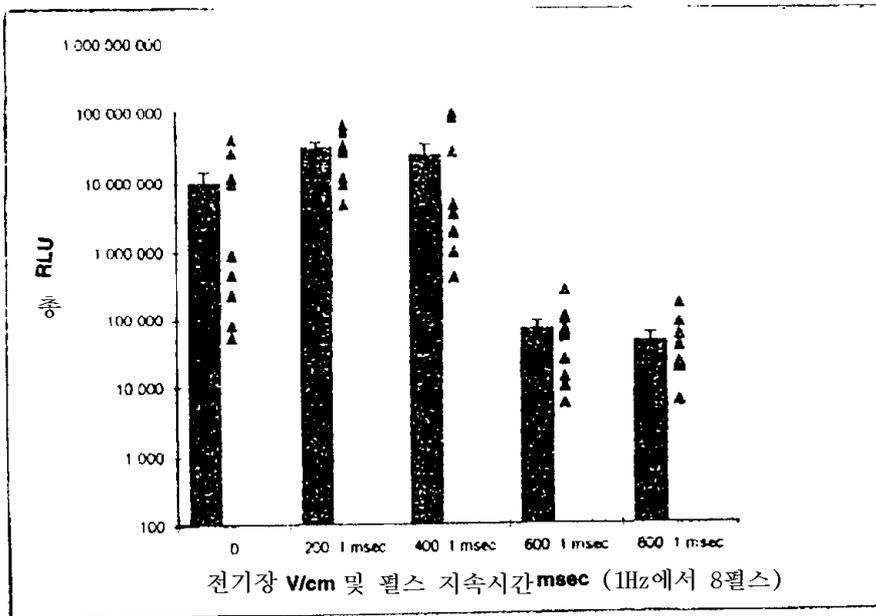
B 직선 스케일



도면2a

도 2 : 마우스에서 뇌 경골근중으로 DNA pX1 2774의 형질감염에 대한
중간 전기장 강도의 전기 펄스 효과. 평균값 \pm SEM

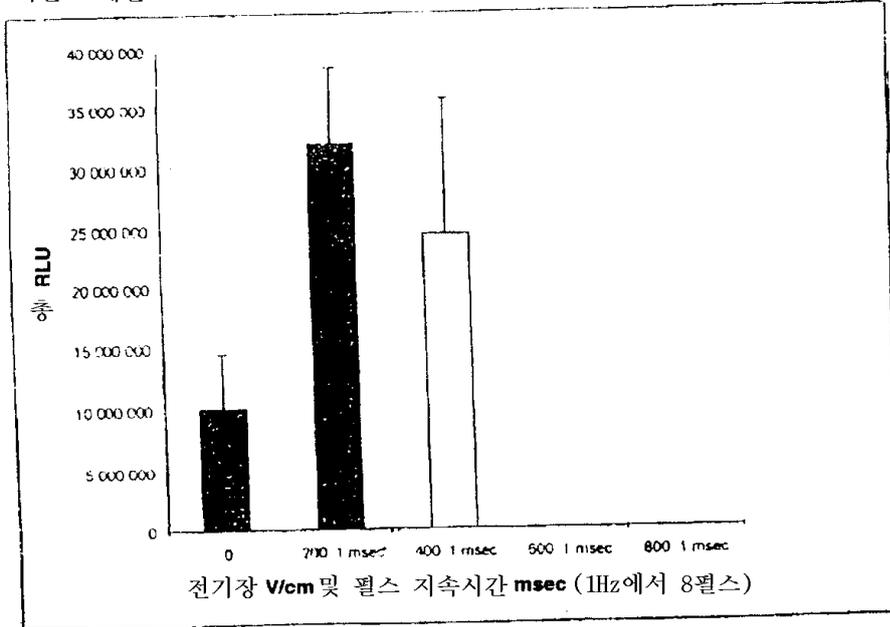
A 로그 스케일



도면2b

도 2 : 마우스에서 뇌 경골근중으로 DNA pX1 2774의 형질감염에 대한 중간 전기장 강도의 전기 펄스 효과. 평균값 \pm SEM

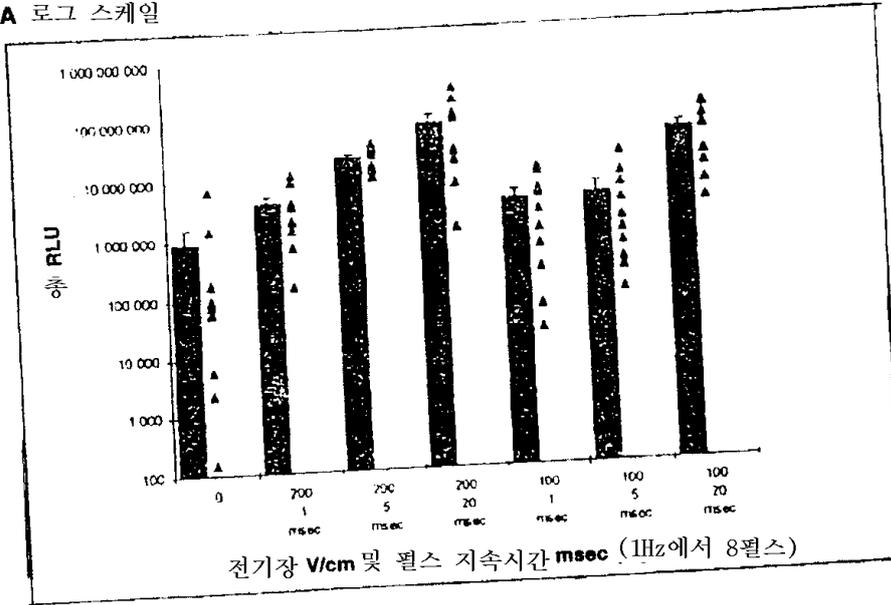
B 직선 스케일



도면3a

도 3 : 마우스에서 뇌 경골근중으로 DNA pX1 2774의 형질감염에 대한 낮은 전기장 강도 및 상이한 지속시간의 전기 펄스 효과. 평균값 ± SEM

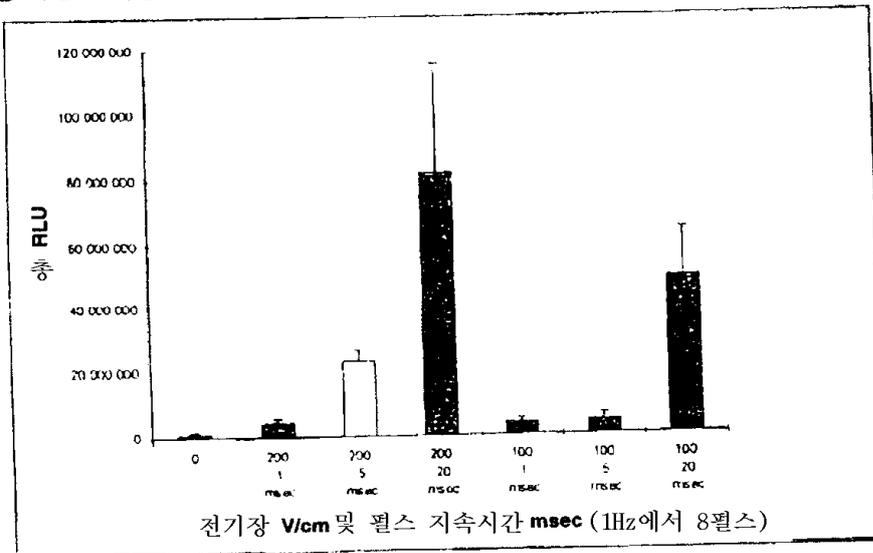
A 로그 스케일



도면3b

도 3 : 마우스에서 뇌 경골근중으로 DNA pX1 2774의 형질감염에 대한 낮은 전기장 강도 및 상이한 지속시간의 전기 펄스 효과. 평균값 ± SEM

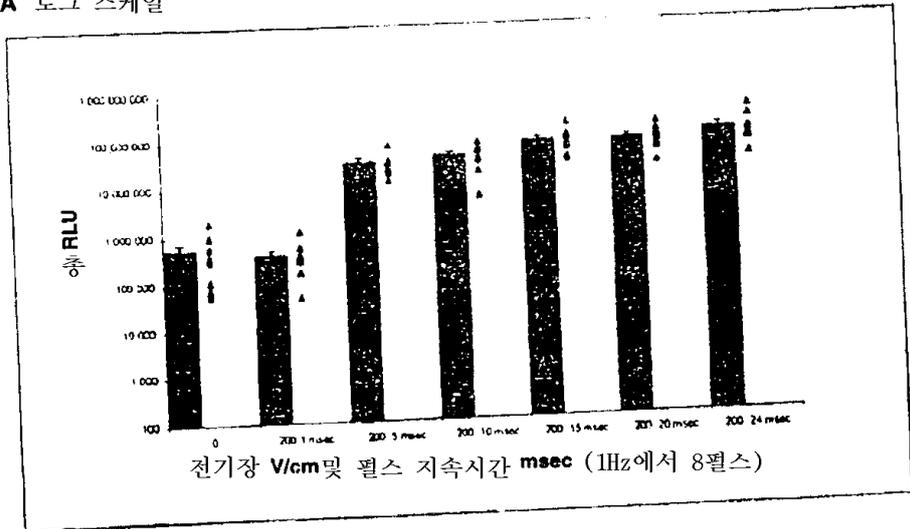
B 직선 스케일



도면4a

도 4 : 마우스에서 뇌 경골근중으로 DNA px1 2774의 형질감염에 대한 낮은 전기장 강도 및 상이한 지속시간의 전기 펄스 효과. 평균값 ± SEM

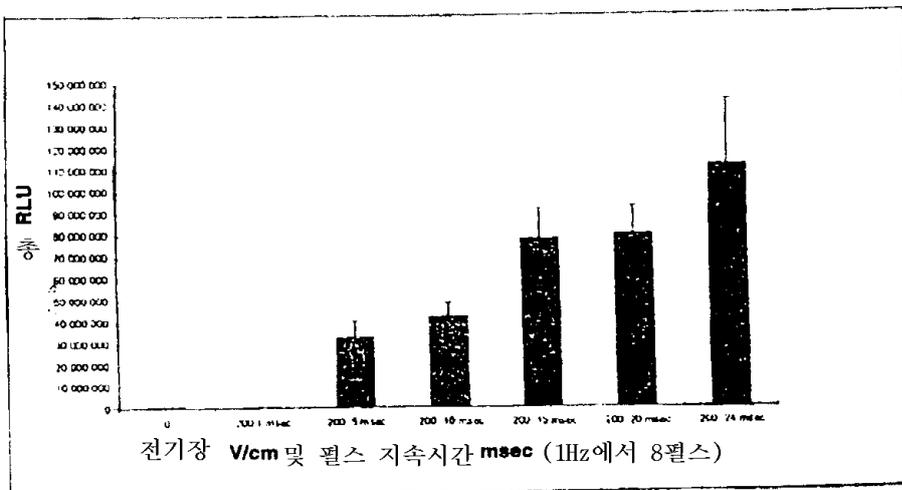
A 로그 스케일



도면4b

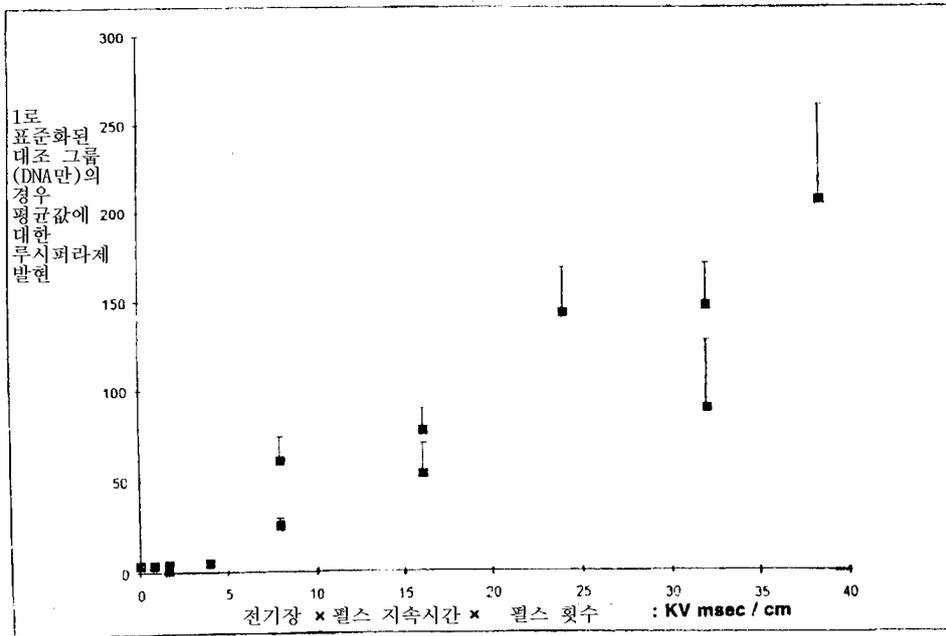
도 4 : 마우스에서 뇌 경골근중으로 DNA px1 2774의 형질감염에 대한 낮은 전기장 강도 및 상이한 지속시간의 전기 펄스 효과. 평균값 ± SEM

B 직선 스케일



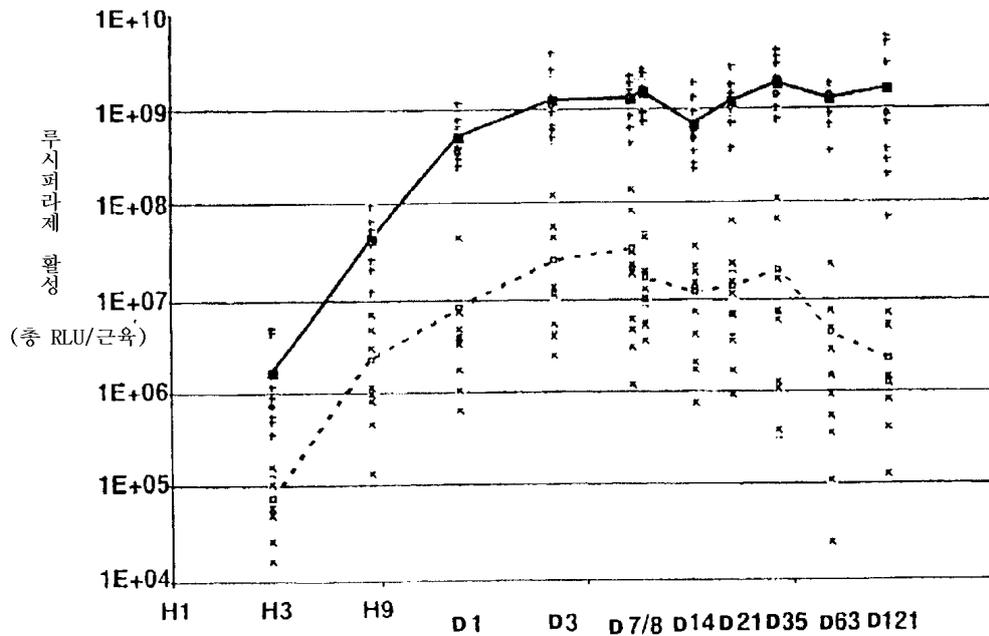
도면5

도 5 : 낮은 전기장 강도에서 마우스의 뇌 경골근중으로 DNA px1 2774의 형질감염 효율 : 평균값 ± SEM

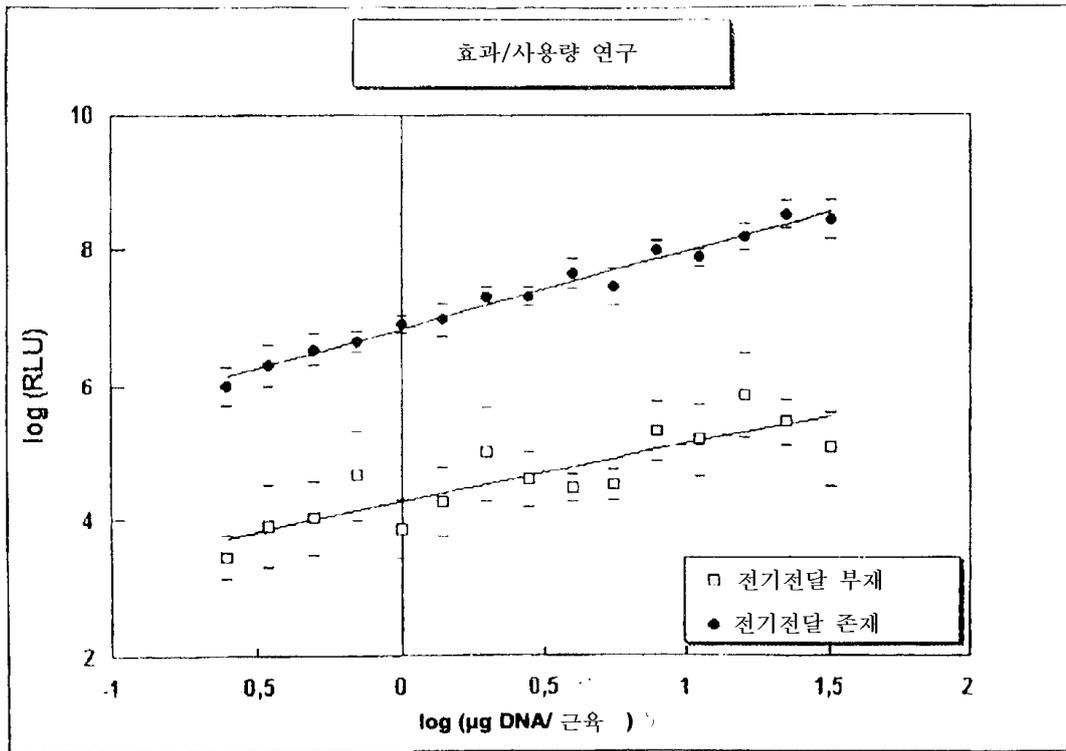


도면6

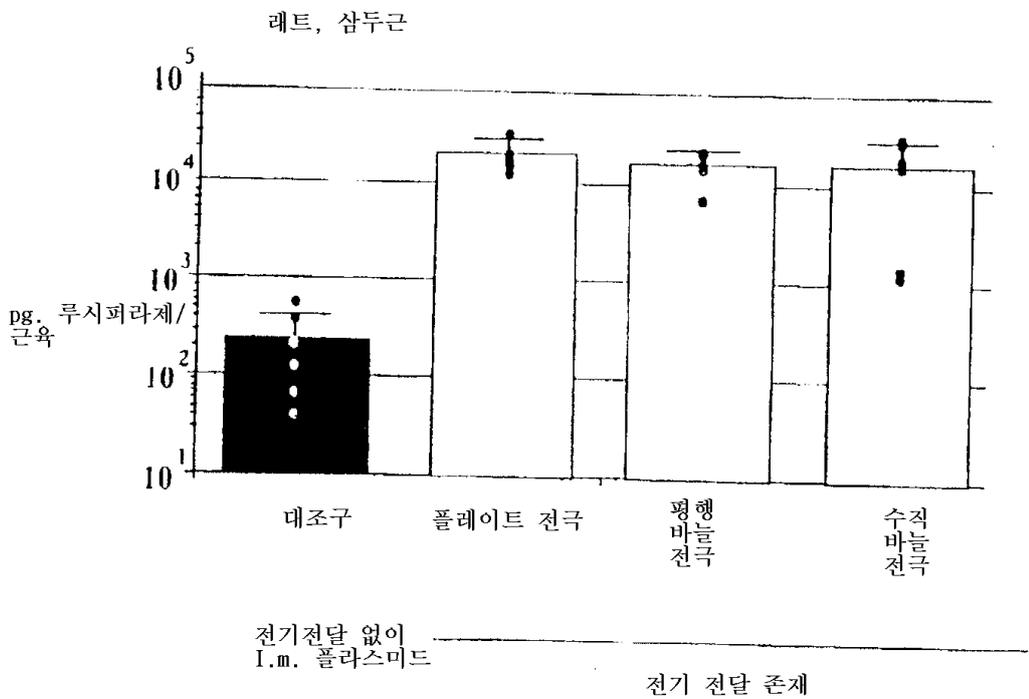
마우스의 뇌 경골근에서 루시페라제의 발현 동역학



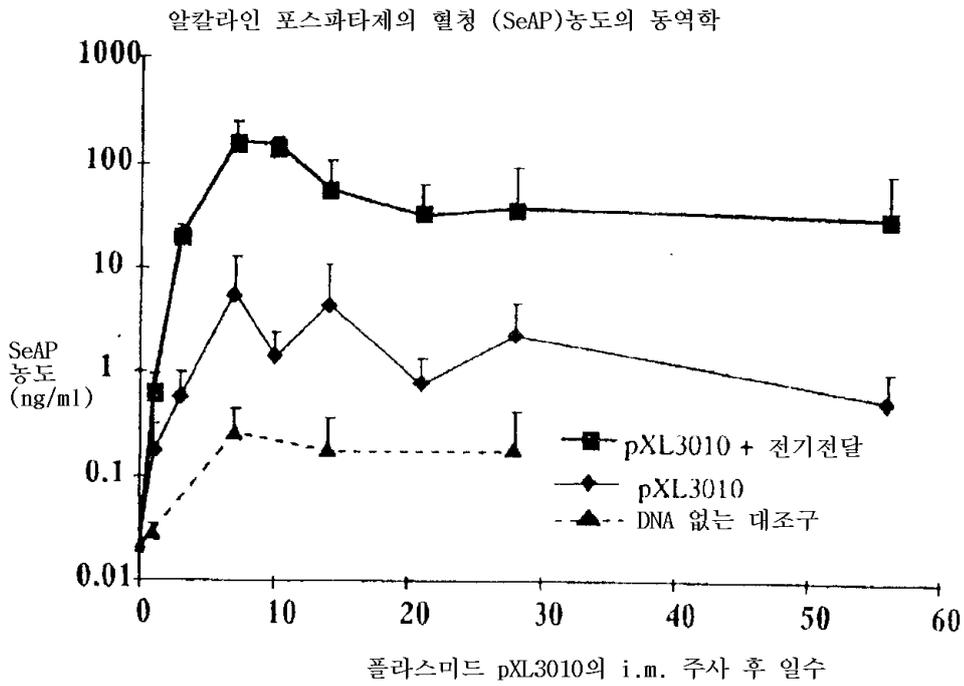
도면7



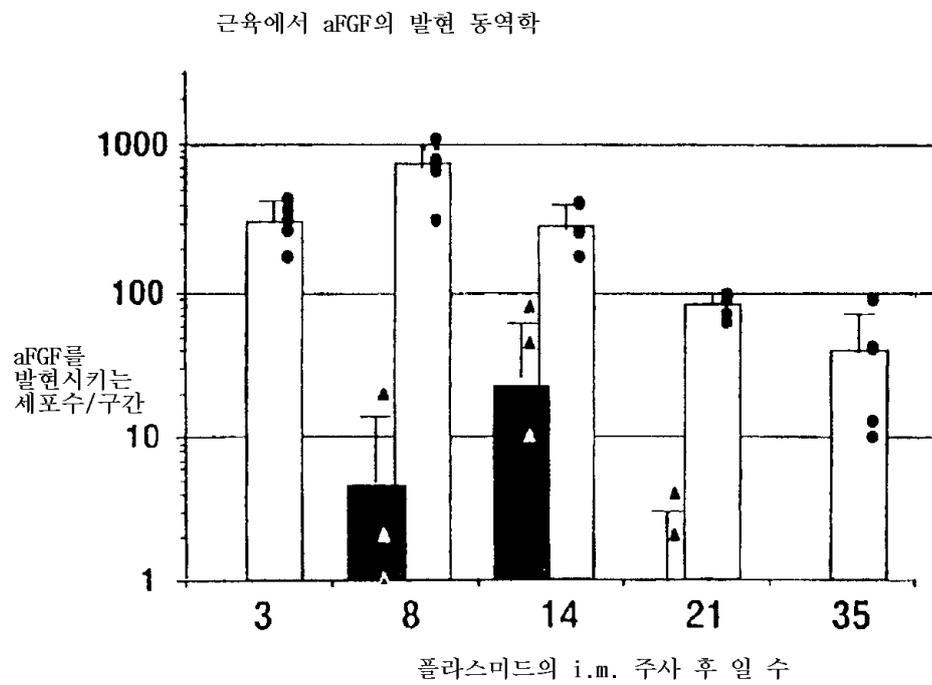
도면8



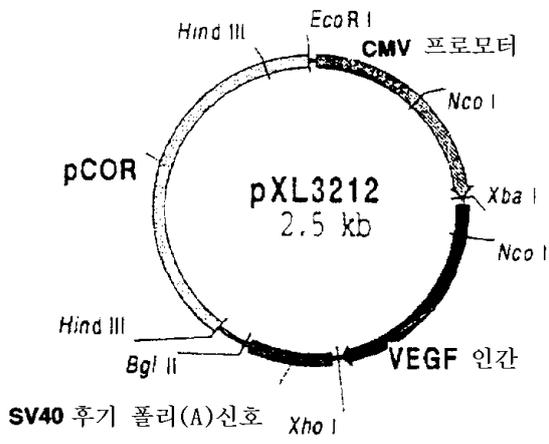
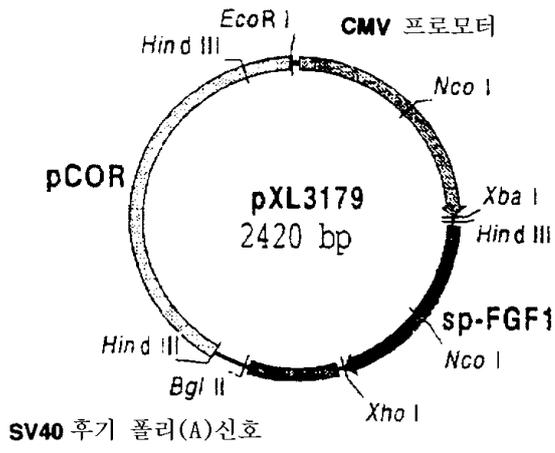
도면9



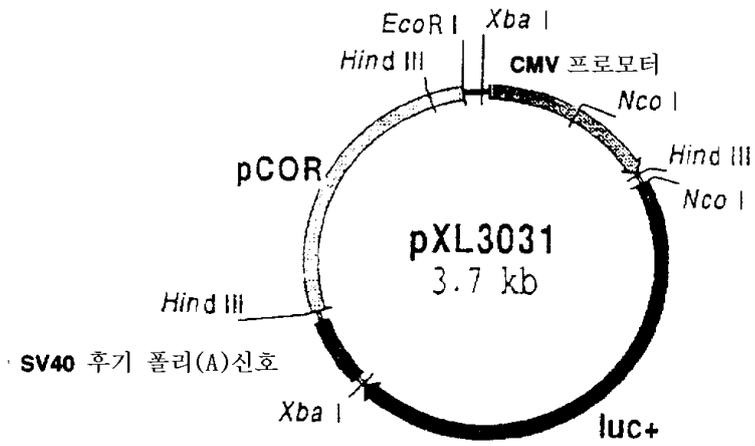
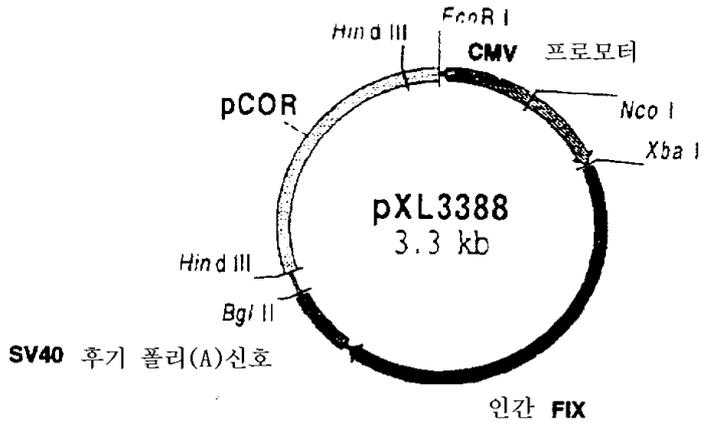
도면10



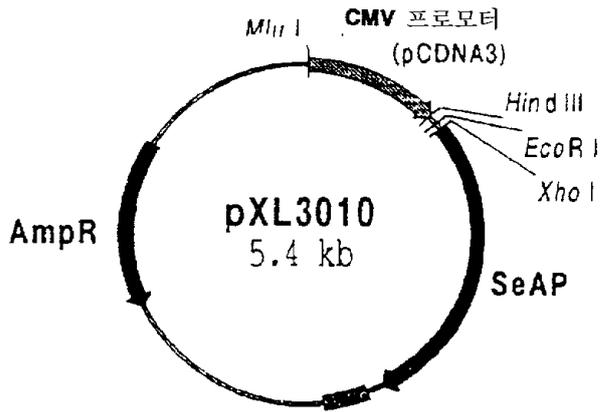
도면11



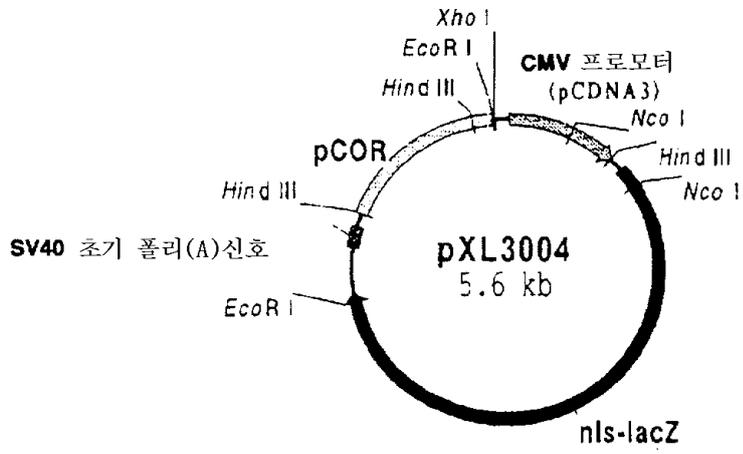
도면 12



도면 13

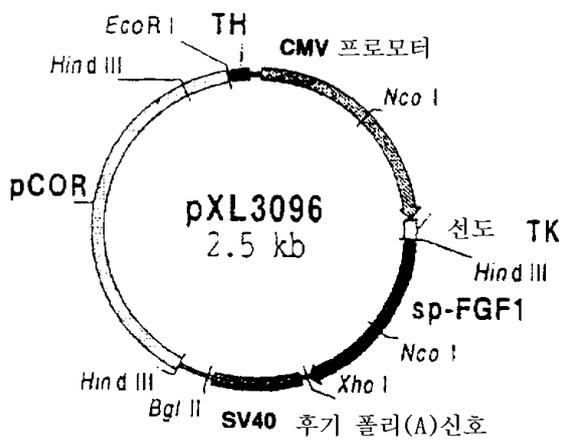
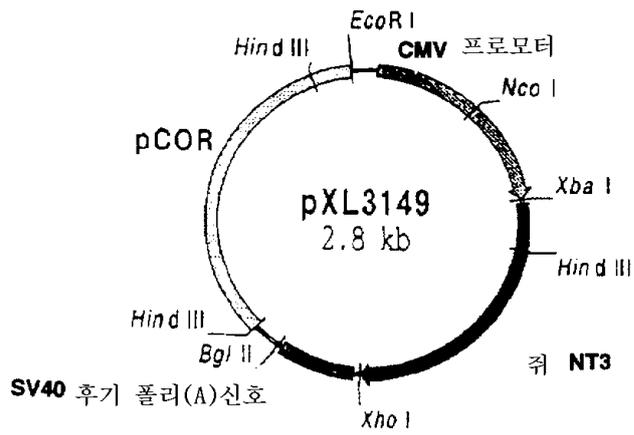


SV40 후기 폴리(A)신호

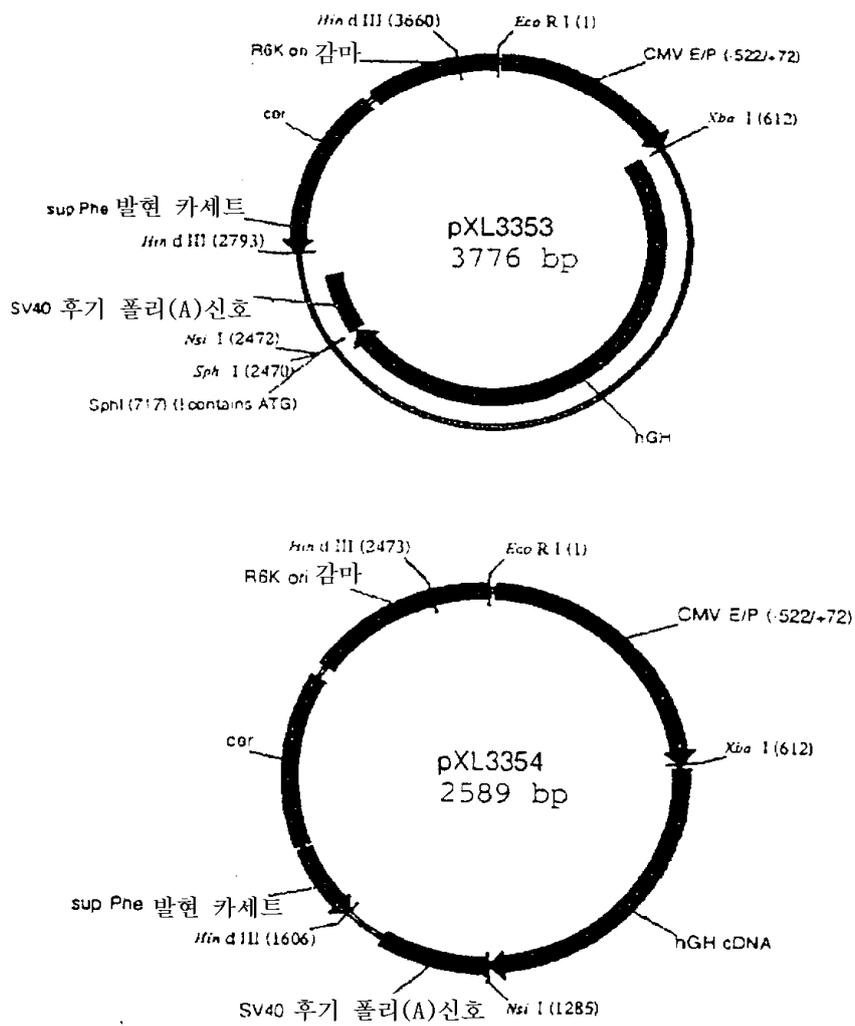


SV40 초기 폴리(A)신호

도면 14



도면 15



도면 16

