



(72)

	,	가525 - 0025	2 -	6 - 28	
	,	가525 - 0025	2 -	12 - 1	- 311
	,	600 - 8853			407
	,	569 - 0082		27 - 3	
	,	가520 - 0043	4 -	7 - 23	- - 2
	,	가524 - 0032		152 - 1	- 102
	,	가525 - 0025		2 - 12 - 1	- 103
	,	가520 - 0014	가 2 -	4 - 7	- 615
	,	가520 - 3333		가 3 - 20 - 9	
	가,	가520 - 2134	5 -	1 - 10	- 202
가 ,		611 - 0028		1 - 1 - 150	

(74)

:

---

(54)

---

가

가

DNA

AIDS

가

DNA

가

( )

( - )

( packaging )

가

가

가

(J.Clin. Invest., 93:1451 - 1457(1994)); Blood, 88:855 - 862 (1996)).

(WO 95/26200).

가

가

WO 97/18318

가

가가

가

가 가

가

( )

( 가 ) 가

가

가

[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:8033 - 8037(1993)]

(pseudo) -

가

가

가 , 가

1 9

2 3 , CH - 296 (%)

3 13 , - , (%)  
/

4 15 , - ,  
(%)

5 15 , - (%)

가

가

가

1)

2)

3)

(1) , 1

3

가

V DEAE -

가

가 ;

1)

2)

가 ;

1)

2)

V DEAE -

가

(Fe)

가

DNA

LTR

DNA 가 (ligation)

(antisense) , (ribozyme), ( false primer) ( , WO 94/02610), ( , WO 90/13641)

가

가 , MFG (ATCC No. 68754), - SGC (ATCC No. 68755) L XSN [BioTechniques, 7:980 - 990 (1989)] , PM5neo [Exp. Hematol., 23:630 - 638 (1995)] (phosphotransferase) 가 G418

(packaging) , PG13 (AATCC CRL - 10686), PG13/LNc8 (ATCC CRL - 10685), PA317 (ATCC CRL - 9078), GP+E - 86 (ATCC CRL - 9642), GP+envAm12 (ATCC CRL - 9641) CRIP [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:64640 - 6464 (1988)]

(Dulbecco's Modified Eagle'sMedium) (Iscoves Modified Dulbecco's Medium) (Gibco)가 가 가 (CS) (FCS) (IL - 3, IL - 6 ), (G - CSF, GM - CSF ), (SCF), (erythropoietin) 가

가  
6:1195 - 1202(1995)].

가

가

[Human Gene Therapy,

가

/

가

( , )

가

4

가

(Hanks' saline),

가

3

37

가 , 가  
 가 ,  
 가 , (WO  
 95/10619) ,

[Human Gene Therapy, 8:1459 - 1467(1997); J.Virol., 70:6468 - 6473(1996)]

가  
 12 - 13 - (phorbol 12 - myristate 13 - aceate)(TPA)  
 (dexamethasone)[Gene Therapy 2:547 - 551 (1995)],

V , DEAE -  
 ( , - )

, 1 - - 3 - (1 - ethyl - 3 - dimethylam  
 inopropylcarbodiimide hydrochloride)

가 , 가

가 , 가  
 가 (polyclonal) 가 (monoclonal) , Fab ,



( , CD )  
CD  
(helper T cell) , -CD34  
CD4 T

N -  
가  
가

1 20

가 (

( )<sub>n</sub> - (GlucNAc)<sub>2</sub>  
[Protein, Nucleic Acid and Enzyme, 43:2631 - 2639(1998)].  
9 ( )<sub>9</sub> - (GlucNAc)<sub>2</sub>  
( 1 )

( , DNA

WO 97/18318

(kit)

[J, Biol. Chem., 256:7277(1981); J.C  
ell. Biol., 102:449(1986)] [J. Cell. Biol., 105:489(1987)]  
5,198,423  
DNA  
71, H - 296 CH - 271 , CH - 296, H - 2

가 1 - 1 - 3 National Institute of Science and Technology, Ministry of International T  
rade and Industry FERM P - 10721 (H - 296)( : 1989, 5, 12), FERM BP - 2799 (CH - 27  
1)( : 1989, 5, 12), FERM BP - 2800 (CH - 296)( : 1989, 5, 12), FERM BP - 2264 (H - 2  
71)( : 1989, 1, 30) (Escherichia coli)

(Escherichia coli) DNA , H - 296  
 VLA - 4 , CH - 271 VLA - 5 , CH - 296  
 [Nature Medicine, 2:876 - 882(1996)]

, 37 5%

G<sub>0</sub> , -  
 - 3, - 6

가  
 가 (amphotrophic)  
 [Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 93:11407 - 11413(1996)].  
 가 -

(transferrin)  
 가  
 (Fe) , 가  
 (chelate) .

,  
 , CD34+ , c- +  
 , B , T ,  
 ,  
 가  
 , CD34 - , c- -  
 가

CD34 / c-

가 , 가 , 가

( , ADA Gaucher's ). ,

man Gene Therapy, 5:153 - 164(1994)]. , AIDS 가 [Hu  
( , HIV HIV T ( , [J.Virol., 69:4045 - 405  
2(1995)]. AIDS HIV T

1

DNA , H - 271 5,198,423 , Escherichia coli HB101/pHD101 (FERM BP - 2264) pHD101

DNA , H - 296 , Escherichia coli HB101/pHD102 (FERM BP - 10721) pHD102

CH - 271

, Escherichia coli HB101/pHD101 (FERM BP - 2799) CH - 271

CH - 296

, Escherichia coli HB101/pHD102 (FERM BP - 2800) CH - 296

C - 274

, Escherichia coli JM109/pTF7221(FERM BP - 1915) 5,102,988  
 . C - 274 .

V, ColV

97/18318

2

, PM5neo [Exp. Hematol.,23:630 - 63  
 8(1995)] , GP+E - 86 (ATCC CRL - 9642) 10% (FCS; Gibco  
 ), 50 /ml 50µg/ml ( 가 Gibco)  
 (Dulvecco's Modified Eagle's Medium)(DMEM; Bio Whittaker) DM  
 EM . 10% FCS 4ml DMEM , 가  
 - (semi - confluence) ( 10 - cm ,  
 Iwaki Glass ) 가 , , PM5neo  
 . 0.45 - ( )  
 , - 80 .

; (EGFP) )가 pLEIN(  
 (packaging) BOSC23 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:8392 - 8396(1993)] ; CR  
 IP [ Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:6460 - 6464(1988). BOSC23  
 Eco - EGFP , CRIP Ampho - EGFP .

, TKNeo [J. Exp. Med., 178:529 - 536(1993)](G  
 P+EnvAm12 (ATCC CRL - 9641)( )  
 . FCS 10% (CSL Gibco) DMEM .

NTH/3T3 (J. Virol.,  
 62:1120 - 1124(1988)] 가 . 1M (cfu/ml)  
 , 가 , 가

3

80µg/ml H - 271, H - 296, C - 274, CH - 271, CH - 296, ColV, (human basic fib  
 loblast)(bFGF; Progen), (tenascin)(Gibco) (epidermal growth factor)(EGF; Taka  
 ra Shuzo) 50µl 2% (BSA, Sigma) 50µl 96 - -  
 (Falcon) 가 . 4 , (PBS; Roman K  
 ogyo) . , 4mg/ml 1  
 - - 3 - (Sigma) 0.1ml .

37 2

4

10<sup>4</sup> L1210 (ATCC CCL - 219) , 10% FCS, 50 /ml 50µg/ml  
 RPMI 1640 (Bio Whittaker) , 50µl PM5neo (10<sup>4</sup> cfu/m  
 l) 가 24 , 0.75mg/ml G4  
 18(Gibco) 가 48 . S. Kim et al.[Ge  
 ne Therapy, 3:1018 - 1020(1996)] , Premix WST - 1 (Takara shuzo )  
 450nm G418 - , WST - 1  
 10µl/100µl 가 37 가 4 ,  
 , 450nm 650nm , (450nm - 650nm)  
 2% BSA . 3  
 1

1

	기능적 물질	비처리	카보다이머드로 처리
실험 1 1	BSA	0.000 ± 0.011	없음
	CH-271	2.099 ± 0.010	2.814 ± 0.079
실험 2 2	BSA	0.000 ± 0.007	0.224 ± 0.031
	H-271	0.777 ± 0.016	0.994 ± 0.029
	H-296	0.474 ± 0.014	0.666 ± 0.021
	C-274	-0.068 ± 0.017	0.100 ± 0.033
	CH-271	0.382 ± 0.017	0.425 ± 0.019
	CH-296	0.363 ± 0.023	0.460 ± 0.007
	ColV	0.644 ± 0.006	0.847 ± 0.033
	bFGF	0.425 ± 0.014	0.580 ± 0.046
	Tenascin	0.060 ± 0.021	0.323 ± 0.037
	EGF	0.030 ± 0.021	0.077 ± 0.038

( ± )

1 , 가 , , H - 271, H - 296, CH - 271, CH - 29  
 6, ColV bFGF ,  
 C - 274, , EGF BSA , , G418 -  
 가 .

CH - 296 , .

0.5ml 40µg/ml CH - 296 24 - - (Falcon) 가 .  
 4 , PBS(pH 5.8) . (ethylenediamine)[NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH  
 2; Nacalai Tesquel], (trimethylenediamine)[NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>; Nacalai Tesquel]  
 (putrescine)[CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>; Nacalai Tesquel] , PBS(pH 5.8) 10mg/ml 1 - 3 -  
 (1 - ethyl - 3 - dimethylaminopropylcarbodiimide hydrochloride)  
 (Sigma) 625µl 가 37 2 .  
 CH - 296 PBS , 2%  
 /PBS , 2% BSA/PBS .

pLEIN가 GP+E86 10% CS DMEM  
 1X10<sup>5</sup> cfu/ml 0.5ml  
 1X10<sup>4</sup> NIH/3T3 (cell detachment buffer) (Bio Whittaker)  
 FACS Vantage (Becton Dickinson) , 488nm 515 - 545nm  
 EGFP - 가  
 2 가 가  
 2 가 가  
 가 CH - 296 , , 2 , 가 2  
 mM 가 가  
 4 가 가  
 (Gibco) (Takara Shuza) 24 - (Falcon)  
 (cocktail method) : 가 가 4  
 37 20 2% BSA , PBS  
 (pre - coating method): 가 가  
 4 가 37  
 2 , 2% BSA , PBS  
 0.5ml  
 10<sup>5</sup> L1210 0.5ml Eco - EGFP (10<sup>5</sup> cfu/ml) 가 24  
 kinson) , 488nm (Bio Whittaker) . FACS Vantage (Becton Dic  
 ( EGFP - ) . 2 5  
 2

기능적 물질 (80 µg/ml)	첨가된 라미닌 농도 및 코팅법			
	미첨가	5 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml
	-	전-코팅	전-코팅	복테일
BSA (2%)	1.12	5.20	6.55	6.22
H-271	5.41	11.19	17.52	9.67
H-296	4.83	5.96	5.51	6.95
CH-271	4.00	6.72	13.73	17.34
CH-296	6.48	7.08	6.02	16.77

%

3

기능적 물질 (80 µg/ml)	첨가된 라미닌 농도			
	미첨가	20 µg/ml	40 µg/ml	60 µg/ml
BSA (2%)	1.36	5.14	4.74	3.82
CH-271	16.89	32.05	24.45	23.46
CH-296	17.80	18.79	20.44	19.31

%

4

첨가된 CH-296 농도	첨가된 라미닌 농도			
	미첨가	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
미첨가	0.69	4.09	6.76	6.89
10 µg/ml	4.67	11.81	9.36	7.01
20 µg/ml	5.16	11.64	10.57	8.49
40 µg/ml	4.41	10.49	11.52	9.11
80 µg/ml	5.11	10.87	11.48	11.10
160 µg/ml	5.19	9.04	11.84	10.88
320 µg/ml	없음	없음	10.27	10.54

%

5

첨가된 CH-271 농도	첨가된 라미닌 농도			
	미첨가	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
미첨가	0.69	4.09	6.76	6.89
10 µg/ml	4.61	7.16	6.28	6.34
20 µg/ml	4.71	12.98	8.98	5.99
40 µg/ml	3.64	17.32	14.50	8.78
80 µg/ml	3.60	18.30	14.76	9.15
160 µg/ml	3.52	16.34	17.08	12.67

%

2 3

CH - 296 CH - 271

8:1( , 80 µg/ml:10 µg/ml) CH - 271/ 16 : 1( , CH - 296/ , 80µg/ml: 5µg/ml) 2.6 C  
 H - 271 5.1 가 , CH - 296

5

(c - kit - positive - bone marrow cells)

6 - 8 C3H/He (Japan SLC)  
 Ficoll - Hypaque(1.0875 g/ml, Pharmacia)  
 PBS Ery - Lysis (155ml NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1m  
 M EDTA pH7.4) , PBS CD117 (Pharminge  
 n) 1µg/10<sup>7</sup> 가 . 30 5mM EDTA  
 0.5% BSA PBS , 가 . 4 30 (Miltenyl Biotec)  
 20µl/10<sup>7</sup> 가 . MACS (Miltenyi B  
 iotec) - - .  
 (Luskey et al.) - [Blood, 80  
 :396 - 402(1992)] , 20% FCS, 20 ng/ml - 3(Genzyme), 50ng/ml  
 - 6(Genzyme), 100ng/ml (Genzyme), 50 /ml 50µg/ml  
 - MEM(Bio Whittaker) 37 5% .  
 80µg/ml CH - 271 24 -  
 2% BSA 30 ,PBS  
 CH - 271 2% BSA 10<sup>5</sup> -  
 0.5ml Eco - EGFP (10<sup>5</sup> cfu/ml) 가 . 48  
 , 0.5ml 가 , 가 24 .  
 4 . 2  
 6 7 .

6

	첨가된 라미닌 농도		
	미첨가	10 µg/ml	20 µg/ml
BSA	0.18	0.25	0.16
CH-271	0.69	3.93	2.64

%

7

	첨가된 라미닌 농도			
	미첨가	2.5 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml
BSA	1.37	1.80	2.63	5.38
CH-271	9.95	16.12	15.28	17.00

%

6 7

, CH - 271  
 ,  
 가 CH - 271 , CH - 271  
 5.7 가 .

, 10<sup>7</sup> cfu/ml 가 Eco - EGFP  
 8 . , 가



8

	첨가된 라미닌 농도			
	미첨가	2 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	6 $\mu\text{g/ml}$
BSA	5.88	11.77	19.33	27.09
H-271	25.12	53.39	55.65	56.45
CH-271	43.06	66.87	73.67	77.76
CH-296	76.84	81.57	83.30	85.48

%

6

CD3 - T -

CD3 - T  
 100 -  $\mu\text{m}$  (Falcon)  
 HBSS (HBSS, Bio Whittaker)  
 T (R & D)  
 T (Pharmingen)  
 1  $\mu\text{g/mg}$ , Pharmingen)  
 50  $\mu\text{g/ml}$   
 37

30 -  $\mu\text{m}$  (Miltenyi Biotec)  
 Ery - Lysis (Miltenyi Biotec)  
 CD3  
 RPMI 1640 (Bio Whittaker)  
 5%

6 - 8 C3H/He  
 10% FCS  
 Hank  
 CD3 -  
 CD3 -  
 CD3  
 CD28  
 10% FCS, 50 /ml  
 5%

5

20  $\mu\text{g/ml}$   
 10<sup>5</sup> CD - T  
 가

80  $\mu\text{g/ml}$  CH - 296  
 0.5ml Eco - EGFP  
 가, 10% FCS, 500 /ml  
 2 (Genzyme), 50 /ml  
 48  
 4

24 -  
 (10<sup>5</sup> cfu/ml) 3  
 - 1 (Ge  
 50  $\mu\text{g/ml}$   
 9

nzyme), 10ng/ml  
 RPMI 1640  
 가

9

기능적 물질	도입 효율 (%)
BSA (control)	0.83
CH-296	8.78
CH-296/퀴 라민	13.20

%

9

CD3 T

가

7

5

5  $\mu\text{g/ml}$

80  $\mu\text{g/ml}$  CH - 271

50  $\mu\text{l}$

9

6 -

50mM (citrate) - (pH 5.0) 500 mU/ml O -  
 (o - glycanase) ( - - N - (endo - - N - acetylgalactosaminidase), Seik  
 agaku Corp.), 500 mU/ml H(endoglycosidase H)( - - N -  
 H(endo - - N - acetylglucosaminidase H, Seikagaku Corp.), 250mU/ml - - (endo - - g  
 alactosidase)(Seikagaku Corp.) 2 mU/ml - ( - mannosidase)(Seikagaku Corp.)  
 . 100 mM - (tris - hydrochloride) (pH 8.6) 250mU/  
 ml F(glycopeptidase F)( : N - F, Takara Shuza)  
 . 50μl 37 20 , PB  
 S

10% FCS, 50 /ml 50μl/ml RPMI 1640 10<sup>4</sup> L  
 1210 50μl PM5neo (10<sup>4</sup> cfu/ml) 가 . 2  
 4 . 0.75 mh/ml G418( Gibco) .  
 가 48 . G418 - 3 , .  
 10 . 10 3 .  
 10

기능적 물질	효소 처리	흡수도
BSA (2%, 대조군 )	없음	0.000 ± 0.030
CH-271 (80 μg/ml)	없음	1.376 ± 0.012
CH-271/ 라미닌 (80 μg/ml : 5 μg/ml)	없음	1.781 ± 0.062
CH-271/라미닌 (80 μg/ml : 5 μg/ml)	O-글리카나아제	1.886 ± 0.071
CH-271/라미닌 (80 μg/ml : 5 μg/ml)	글리코시다아제 H	1.214 ± 0.017
CH-271/라미닌 (80 μg/ml : 5 μg/ml)	E-β-갈락토시다아제	1.939 ± 0.083
CH-271/라미닌 (80 μg/ml : 5 μg/ml)	α-만노시다아제	1.657 ± 0.033
CH-271/라미닌 (80 μg/ml : 5 μg/ml)	글리코펩티다아제 F	1.610 ± 0.036

10 , CH - 271 , CH - 271 , G -  
 418 - 가 . , H(endoglycosidase)  
 se) F(glycopeptidase F) ( - manosida  
 [Biochim. Biophys. Acta, 883:112 - 126(1986)] ,  
 N - . N - 43 .  
 H , (asparagine) - N -  
 . 1 - 2 - / 1 - 6 - , ( )  
 9 - (GluNAc)<sub>2</sub> - Asn / ( )<sub>6</sub> - (GluNAc)<sub>2</sub> - Ans , -  
 .  
 ( )<sub>9</sub> - (GluNAc)<sub>2</sub> - Asn .

가 Sepharose CL - 2B(Pharmacia) , 가 (sigma) 1g  
 가 , , 10mM 20ml 50mM -  
 (pH 7.2) 20mg E(Actinase E) (Kaken Pharmaceutical) 37 2  
 , Sephadex G - 15 (50ml) Sephadex G - 25(150ml)  
 ( )<sub>9</sub> - (GluNAc)<sub>2</sub> - Asn . 1 가 ( )  
 )<sub>9</sub> - (GluNAc)<sub>2</sub> - Asn .

CH - 271 ( )<sub>9</sub> - (GluNAc)<sub>2</sub> - Asn .  
 , 96 - (ELISA - ) (Sumito Bakelite) 4mg/ml  
 37 2 , . 2% BSA 80µg/mg CH - 271  
 ( )<sub>9</sub> - (GluNAc)<sub>2</sub> - Asn 50µl 96 -  
 가 . 37 2 . 0.2% (glycine)  
 4 15 , , .

10<sup>3</sup> L1210 0.1ml Eco - EGFP (10<sup>6</sup> cfu/ml) 가 .  
 48 , FCS, , 0.1ml RPMI 1640  
 가 . 24 가 . 4  
 . 11 .

11

기능적 물질 (80 µg/ml)	첨가된 당쇄 농도						
	미첨가	2.8 µg/ml	5.5 µg/ml	11.1 µg/ml	22.1 µg/ml	44.2 µg/ml	88.5 µg/ml
BSA (2%)	1.68	없음	없음	없음	1.24	1.65	없음
CH-271	26.9	27.1	29.9	34.7	39.2	52.0	58.7

% .

11 , ( )<sub>9</sub> - (GluNAc)<sub>2</sub> - Asn CH - 271  
 가 . ,

8

- CD4 CD4 - .

4

- CD44 , 24 - - 1µg/ml - CD4  
 ( Pharmingen ) 80µg/ml H - 271, CH - 271 CH - 2  
 96 . H - 271 , CH - 271 CH - 296

0.5ml Eco - EGFP (10<sup>7</sup> cfu/ml) 가 32 3  
 , 10% FCS, 50 /ml 50 µg/ml RPMI 1640  
 6 , - 10<sup>5</sup> CD3 - T  
 3 가 , 10% FCS, 500 - 1 , 10ng/ml  
 - 2, 50 /ml 50µg/ml RPMI1640 가  
 가 48 , ,  
 (phycoerythrin) (PE;Pharmingen) (propinium iodide) (PI;Sigma) - C  
 D4 (Pharmingen) 488nm 515 - 545nm 562 - 588nm  
 FACS Vantage , CD4 CD4 EGF  
 P . CD4 - T CD4 -  
 12 . 12 4

12

기능적 물질	CD4-양성세포내로 효율 도입(%)	CD4-음성세포내로 효율 도입(%)
BSA ( 대조군 )	0.16 ± 0.07	0.11 ± 0.07
항-CD4 항체	0.24 ± 0.19	0.12 ± 0.04
항-CD44 항체	1.92 ± 0.82	1.95 ± 1.00
H-271	31.02 ± 7.34	16.54 ± 4.30
항-CD4 항체 / H-271	58.91 ± 8.11	20.32 ± 4.46
항-CD44 항체 / H-271	56.08 ± 7.53	40.96 ± 7.04
CH-271	44.63 ± 6.40	26.21 ± 5.73
항-CD4 항체 / CH-271	64.81 ± 9.74	25.97 ± 1.25
항-CD44 항체 / CH-271	60.29 ± 8.71	44.10 ± 3.56
CH-296	48.81 ± 8.77	29.45 ± 4.70
항-CD4 항체 / CH-296	62.93 ± 6.45	30.84 ± 3.27
항-CD44 항체 / CH-296	56.79 ± 9.87	41.37 ± 1.14

( ± )

12 , CD3 - T 가  
 , CD4 가  
 - CD4 , CD4 - CD4 - , - CD4  
 H - 271 CD4 - ( 60 % )  
 CD4 - 20% . CH - 271 CH - 276  
 ,  
 , CD44 CD4 - CD4 - 98% ,  
 - CD4 가 CD4  
 가 12

9

- CD8a CD8 - .  
 H - 271 8  
 igen) , - CD8a (Pharmingen) - CD44 (Pharm  
 CD8 - . (PE; Pharmongen) - CD8a CD8 -  
 13 13 2 .  
 13

기능적 물질	CD8-양성세포내로 효율 도입(%)	CD8-음성세포내로 효율 도입(%)
BSA ( 대조군 )	0.22 ± 0.08	0.28 ± 0.00
항-C8a 항체	0.36 ± 0.20	0.28 ± 0.02
항-CD44 항체	0.98 ± 0.34	0.92 ± 0.20
H-271	20.08 ± 4.71	26.43 ± 6.07
항-C8a 항체 / H-271	36.07 ± 1.57	24.42 ± 0.55
항-CD44 항체 / H-271	46.93 ± 0.88	47.16 ± 0.75

( ± )

13 CD3 - T , - CD8a 가 .  
 8 , - CD8a , CD8 - , CD8 - CD8 98%  
 , CD44 , CD8 - CD8 -  
 8 9 .  
 ( )  
 10

4 , 80µg/ml CH - 271 1µg/ml ( - CD4,  
 - CD8, - CD44, - CD49c, - CD49d - CD49e ; Pharmingen )  
 24 -

K562( , ATCC CCL - 243), HSB - 2( , CCRF - HSB - 2, A  
 TCC CCL - 120.1), MOLT - 3( , ATCC CRL - 1552) TF - 1( ,  
 ATCC CRL - 2003) FACS

0.5ml - EGFP (1X10<sup>6</sup> cfu/ml) 가 32  
 3 , 10% FSC, 50 /ml 50µg/ml RPMI 16  
 40 . 1ml 1X10<sup>5</sup> 가 가 3  
 , 4

14 . 3

14

이용된 항체	이용된 세포							
	HSB-2		MOLT-3		TF-1		K562	
	도입 효율 (%)	CD 항원 발현비	도입 효율 (%)	CD 항원 발현비	도입 효율 (%)	CD 항원 발현비	도입 효율 (%)	CD 항원 발현비
없음	100	-	100	-	100	-	100	-
CD4	106.7	-	100.7	+/-	108.8	+/-	104.9	-
CD8	130.4	++	130.4	++	107.0	-	116.9	-
CD44	173.7	++	172.5	++	188.9	+++	135.1	-
CD49c	153.9	+++	102.7	-	115.6	-	106.3	-
CD49d	159.2	++	165.3	+++	150.3	+++	97.5	-
CD49e	185.5	+++	127.5	+	128.9	++	172.6	+++

(Transfer eff.) , 가 100% 가

CD (CD ag exp. ratio) , FACS (%)

- : 10% ; +/- : 10 - 30%; + : 30 - 60%; ++ : 60 - 90%; +++ : 90%

14 가 , CH - 271

, CH - 271 80µg/ml

. 3

15

15

이용된 항체	이용된 세포							
	HSB-2		MOLT-3		TF-1		K562	
	도입 효율 (%)	CD 항원 발현비	도입 효율 (%)	CD 항원 발현비	도입 효율 (%)	CD 항원 발현비	도입 효율 (%)	CD 항원 발현비
없음	100	-	100	-	100	-	100	-
CD4	103.3	-	104.1	+/-	98.6	+/-	99.4	-
CD8	116.3	++	136.7	++	100.8	-	92.4	-
CD44	155.5	++	144.9	++	253.1	+++	102.6	-
CD49c	160.1	+++	104.7	-	116.1	-	100.6	-
CD49d	138.2	++	156.3	+++	187.7	+++	103.1	-
CD49e	142.5	+++	140.0	+	166.1	++	129.2	+++

가 100% 가

CD (CD ag exp. ratio) , FACS (%)

- : 10% ; +/- : 10 - 30%; + : 30 - 60%; ++ : 60 - 90%; +++ : 90%

15

가

11

, 10% FCS, 50 /ml , 50µg/ml RPMI 1640  
 HL - 60 (ATCC CCL - 240) (Sigma)  
 5% 37 20  
 2X10<sup>5</sup> /ml

80µg/ml CH - 271 0.5ml 24 - 가 4  
 , 2% BSA 30 PBS . 0.5ml Ampho - EGFP  
 (10<sup>6</sup> cfu/ml) 가 32 3 10% FCS,  
 50 /ml 50µg/ml RPMI 1640 . 10<sup>5</sup> - HL  
 - 60 가 48 . 10% FCS, 50 /ml 50µg/ml  
 RPMI 1640 0.5ml 가 24 가  
 4 , 16 17

16

디페록사민 농도 (µg)	기능적 물질	도입 효율 (%)
미첨가	BSA ( 대조군 )	0.01
미첨가	CH-271	0.14
6.25	CH-271	0.22
12.5	CH-271	0.27
25	CH-271	0.35
50	CH-271	0.71

17

디페록사민 농도 (µg)	기능적 물질	도입 효율 (%)
미첨가	BSA ( 대조군 )	0.02
미첨가	CH-271	0.25
40	CH-271	11.14

16 17 , 20 , HL - 60  
 가 , CH - 271 HL - 60

12

2 TKNeo DMEM, NIH/3T3 (ATCC CRL - 1658)  
 CRIP 312.5 cfu/ml

0.5ml 32µg/ml CH - 296 24 - 가  
 2 , 2% BSA 30 , PBS  
 1ml 2X 10<sup>4</sup> NIH/3T3 가 37  
 0.75mg/ml G418 10 . G418  
 G418 - 18

18

회석액	유전자 도입 효율(%)
DMEM ( 대조군 )	100
NIH/3T3 세포 배양 상등액	20.6
φCRIP 세포 배양 상등액	15.7

18 , DMEM , NIH/3T3  
 CRIP 1/5  
 . NIH/3T3 CRIP GP+EmvAm12 (Parent strains) ,  
 TKNeo

13

Neo , 12 - 2 , TK  
 CRIP 5000cfu/ml

1ml , 11 , CH - 296 가  
 1 5 CH - 296 PBS  
 . 2X10<sup>4</sup> NIH/3T3 1ml DMEM 가 ,  
 1ml 2X10<sup>4</sup> NIH/3T3 , CH - 296  
 37 . 0.75mg/ml G4518  
 10 , . G418 G418 -  
 3

3

가 CH - 296

14



CS DMEM pLEIN CRIP 10%  
 , 10% FCS 가 10cm (semi - confluence)  
 7ml RPMI 1640 5mM (Nacalai Tesque) 10% FCS  
 7ml RPMI 1640 24 0.45 $\mu$ m  
 가 2 가  
 3.3X10<sup>4</sup> cfu/ml, , 5mM  
 2 X 10<sup>6</sup> cfu/ml

HL - 60 0.5ml 12  
 CH - 296 가 37 3 CH -  
 296 , PBS , 10% FCS 5X 10<sup>4</sup> HL - 60  
 0.5ml RPMI 1640 가 , 5X 10<sup>4</sup> HL - 60  
 0.5ml 가 CH - 296 가 37  
 가 , 10% FCS 1ml RPMI 1640  
 가 가 48 , , 4  
 19

실험 그룹/ 바이러스 상등액	세포수 (세포/플레이트)	유전자 도입 효율(%)
CH-296		
소듐 부티레이트 : -	2.0 x 10 <sup>5</sup>	2.21
소듐 부티레이트 : +	1.8 x 10 <sup>5</sup>	52.98
대조군		
소듐 부티레이트 : -	1.7 x 10 <sup>5</sup>	2.74
소듐 부티레이트 : +	4.0 x 10 <sup>5</sup>	35.46

19 , 가 ,  
 , 가 ,  
 가 CH - 296 , ,  
 가 , CH - 296

, DEAE -

PBS 10mg/ml DEAE - (Sigma) 0.22 $\mu$ m  
 . 10 PBS 1 DEAE - 1.1ml  
 6 - - (Iwaki Glass) 가 4  
 DEAE - . 2 ml 2% BSA 가 30  
 2ml/ PBS , PBS DEAE -

가 , pLEIN GP+E86  
 [ J.Virol.,62:1120 - 1124(1988)]  
 . 10% CS 20 DMEM 1 1ml  
 ( 1.6 X10<sup>6</sup> cfu/ml) 가 . 37 2 , , 2ml/ PBS  
 . 5X10<sup>4</sup> NIH/3T3 가 . 5% 37 3  
 . EGFP - , 4  
 . 20 .

20

코팅	유전자 도입 효율(%)
DEAE-렉스트란	26.7
대조군	0.7

EGFP -

20

, DEAE -

15

[Pro.Natl.Acad.Sci.USA,84:2150 - 2154(1987)]  
 DOL 가 CRIP 10% CS, 50 /ml 50µg/ml DMEM  
 . DOL 가 - 10 - cm  
 10% CS 5ml DMEM . 24 , 0.45µm (Millipore)  
 가 8.7X10<sup>5</sup> cfu/ml .

(50ml , Falcon)  
 CH - 296 , 40µg/ml CH - 296 3ml PBS  
 . 4 16 . CH - 296 2% BSA 3.5ml  
 PBS 가 , 5ml (HBSS, Gibco)

DOL , CH - 296 , 5m  
 I - DOL , 10 100 . 2  
 900Xg 25 3 가 CH - 296 ,  
 - 296 6 - 가 40µg/ml CH - 296 PBS , CH  
 7 4 (Falcon) 가 8µg/cm<sup>2</sup> . 3

가 CH - 296 NIH/3T3  
 , CH - 296 ,  
 1X10<sup>5</sup> NIH/3T3 . 37 3 ( ,  
 ) , ( ,  
 가 , 37 3 NIH/3T3 CH - 296  
 13 . 4 . 4 ,

4  
 , CH - 296 ( )  
 가 , CH - 296  
 , ( ) 가  
 . 21 .

21

Sample	바이러스 역가 (cfu/ml)	결합 후 회수(%)
바이러스 상등액 (사용전)	$8.7 \times 10^5$	100
모은 상등액 (결합전)	$7.8 \times 10^5$	89.4
모은 상등액 (원심분리전)	$7.6 \times 10^4$	8.8

21 , , 80 90% 가 ,  
 가 CH - 296 1/10 PB  
 S 2% 가 CH - 296

가  
 , GP+E86 ( WO 95/10619). 14  
 u/ml NIH/3T3 5ml ,  $1 \times 10^5$  cf  
 CH - 296 가 30 , 2900Xg 4  
 , PBS 37 4 가 ( ). C  
 H - 296 가 , 2 가  
 30 2900xg 4 ( - ).  
 , CH - 296 ,  $1 \times 10^5$  NIH/3T3  
 60 - mm , 2 . EGFP 4  
 , 5

5

(57)

- 1.
- 1) ;
- 2) 가 ;

3) 가 ,

2.

1 3 , ,

3.

1 2 , 가 .  
(1)

4.

3 , (1) ,

5.

1 4 , V , DEAE - , ,

6.

1 5 ,

7.

1 6 , 가

8.

7 , - , , , ,

9.

1 8 ,

10.

1 9 ,

11.

10 , .

12.

가 :

1) ;

2)

13.

12 , 가 .

14.

가 :

1) ;

2) , ,

15.

12 14 , , DEAE - , , V , .

16.

15 , .

17.

12 16 , 가 가 .

18.

17 , .

19.

, (Fe)

20.

19

21.

가

22.

21

23.

22

24.

21

23

V

25.

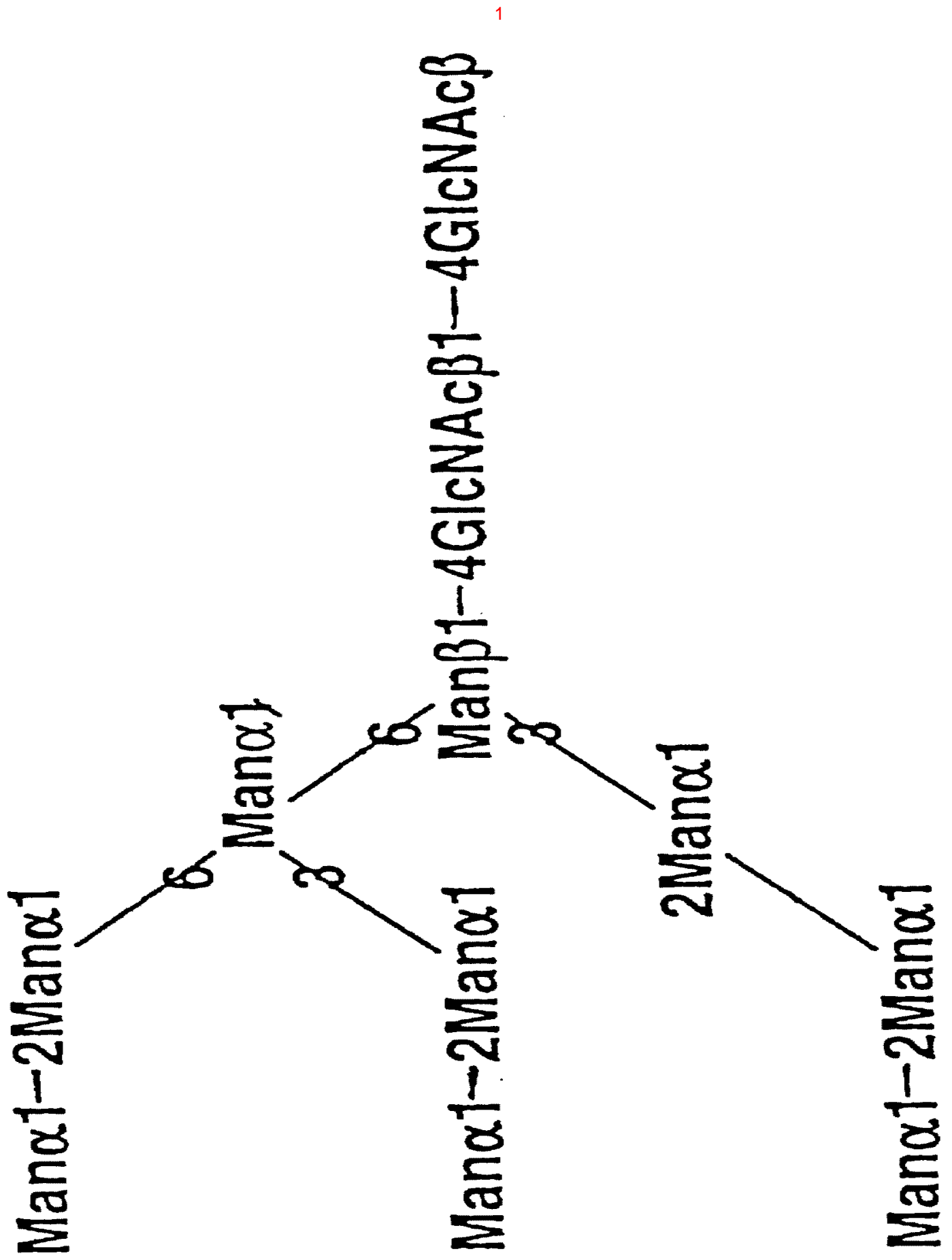
21

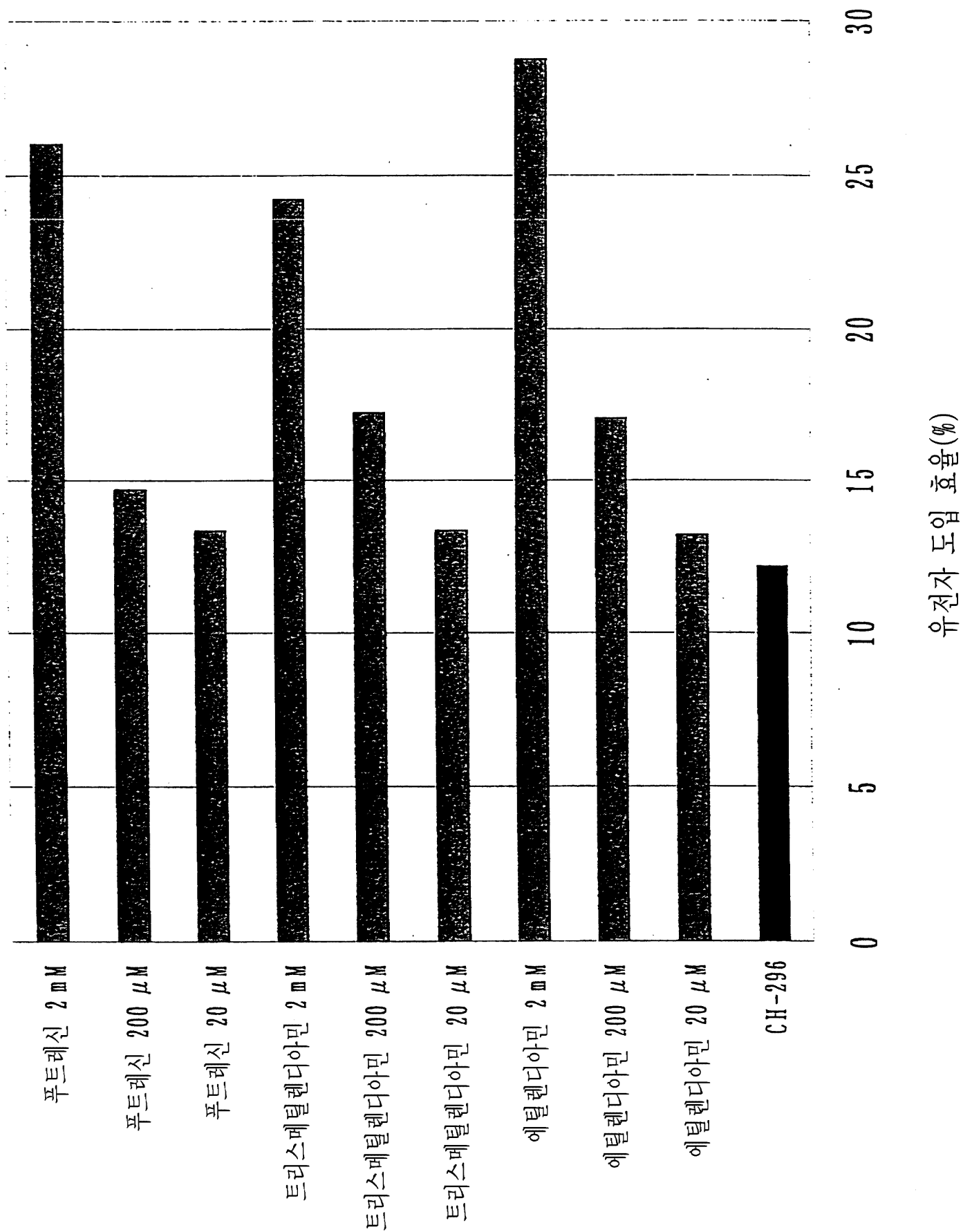
24

가

26.

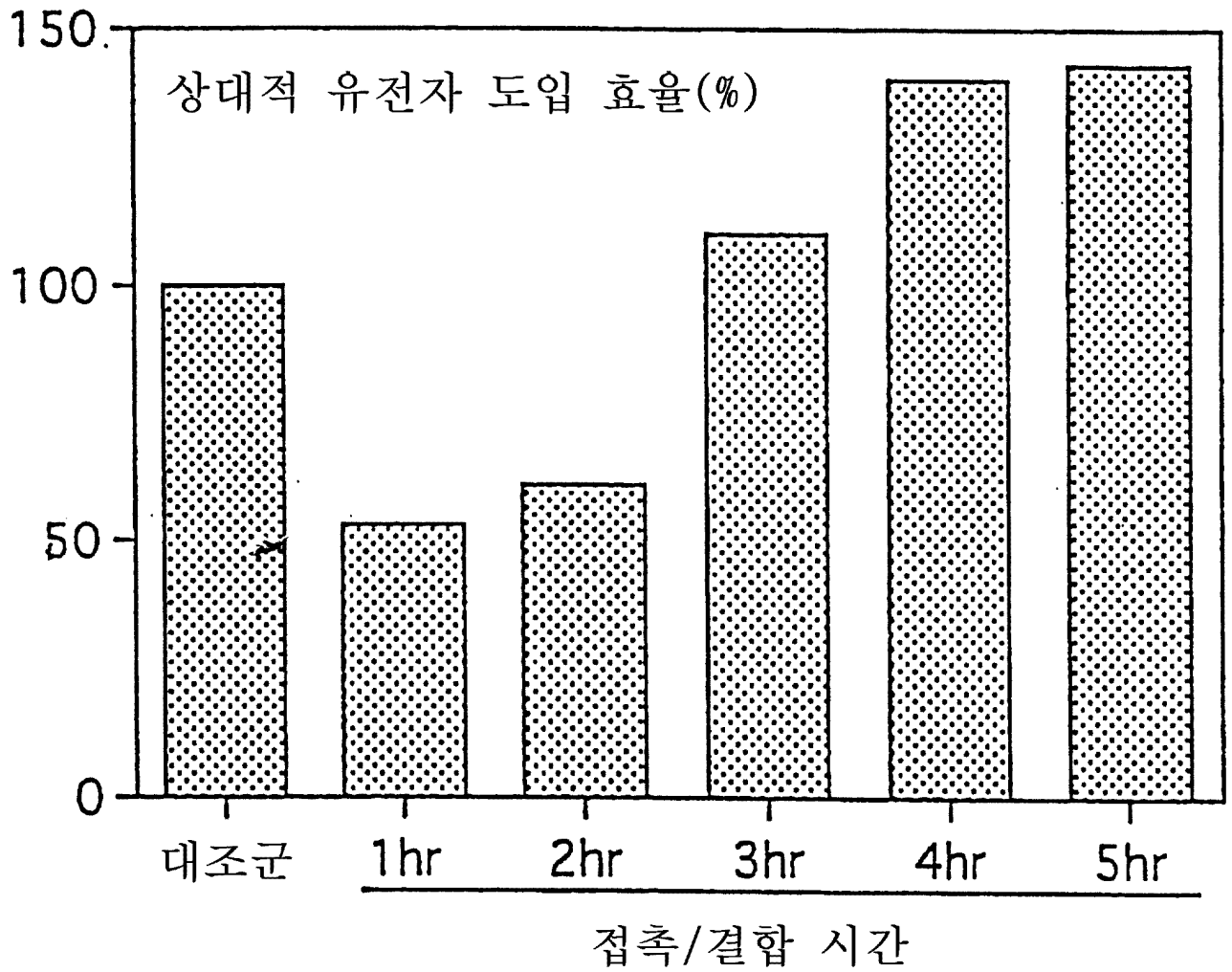
25



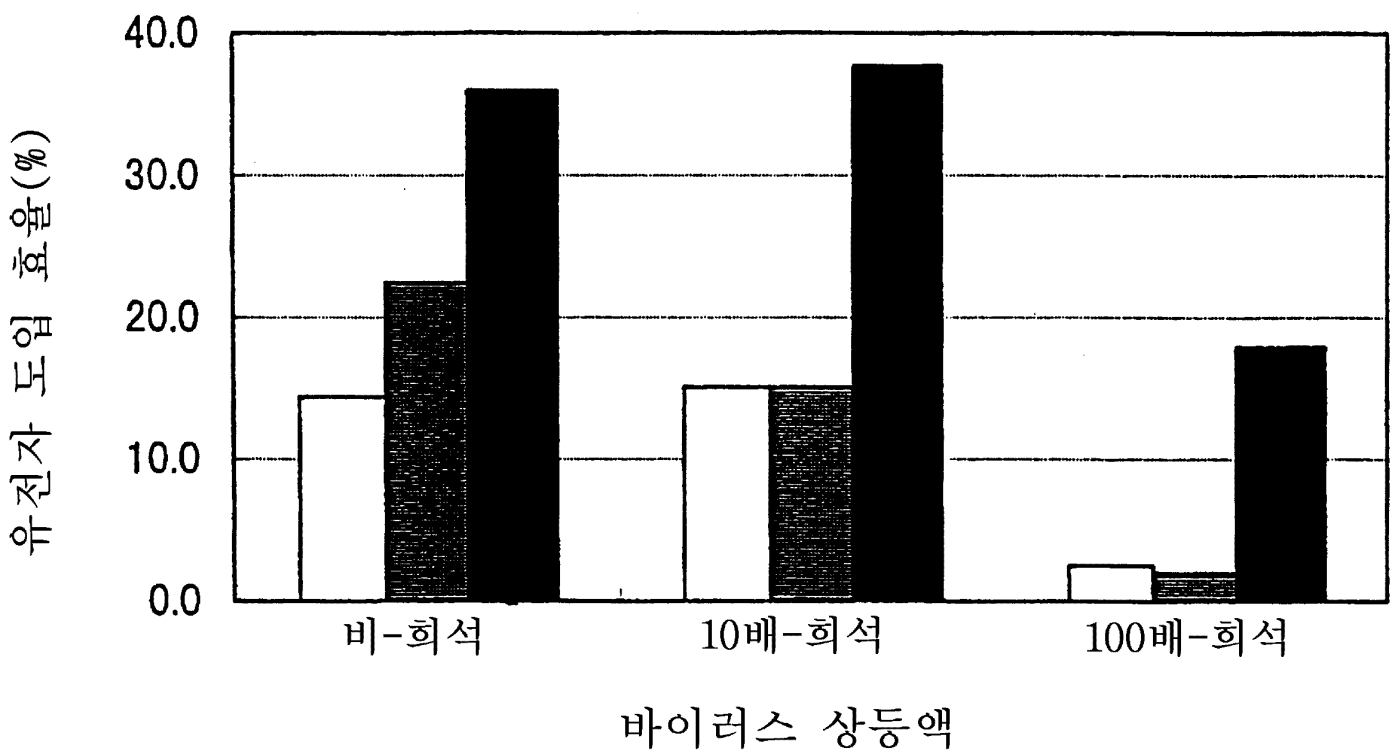




3



4



5

