

## 유전자 수송계의 현재까지의 연구동향 및 앞으로의 개발전략

최우정 · 김종국†

서울대학교 약학대학  
(2000년 1월 10일 접수)

### Recent Advances and Future Strategy in Gene Delivery System

Woo-Jeong Choi and Chong-Kook Kim†

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea  
(Received January 10, 2000)

**ABSTRACT**—Gene therapy is a method for the treatment of diseases with introducing the gene-engineered materials into a patient with gene-deficiency disease (e.g. cystic fibrosis) or cancer to produce a therapeutic protein in a patient's cells. Successful gene therapy requires establishing both gene expression systems and delivery systems. Viral and non-viral vectors have been used for gene delivery. Viral vectors have a high transfection efficiency, but are limited in relations to issues of safety, toxicity and immunogenicity. Non-viral vectors are easy to prepare and relatively safe. However, non-viral vectors have a low transfection efficiency. Cationic liposomes are the most available among non-viral vectors. Cationic liposomes have been used to transfect cells both *in vitro* and *in vivo* experiments. Besides, several formulations containing cationic lipid are being used in clinical trials in cases of cystic fibrosis or cancer. A crucial subject to the further development of gene delivery vectors will be a long-term gene expression with following characteristics; protecting and delivering DNA efficiently, non-toxic and non-immunogenic, and easy to produce in large scale.

**Keywords**—Gene therapy, Gene expression system, Gene delivery system, Viral vector, Non-viral vector, Cationic liposome, Targeting, Ligand

유전자 치료요법(gene therapy)은 낭포성 섬유증(cystic fibrosis)과 같은 유전자 결핍에 의한 질병 또는 암과 같은 종양을 가진 환자들에게 유전 물질을 투여함으로써 환자들의 세포 또는 조직 내에서 치료 단백질(therapeutic protein)을 생성하여 질병을 치료하는 방법이다.<sup>1-3)</sup> 유전자 치료요법은 1987년 *in vitro*계에서 transfection 물질로 Lipofectin™(DOT MA:DOPE=1:1 (w/w))을 도입한 것을 시작으로 하여, 1990년 처음으로 중증복합면역결핍증(severe combined immunodeficiency, SCID)에 걸린 환자의 백혈구에 아데노신 디아미나아제 유전자를 투여하는데 레트로바이러스를 사용하는 임상실험에 사용되었다.<sup>2,3)</sup>

그리고, 보다 넓은 범위의 임상실험에 적용시키기 위하여 1) 종양 세포의 활성화에 대한 숙주의 기능을 증진시킬 수 있도록 면역계를 촉진시키는 방법 2) 종양 세포에서 생산되는 단백질을 감소시킬 수 있도록 메커니즘을 설계하는 방법 3) 종양 세포에서 제거되거나 변화된 종양 억제 유전자를 대체하는 방법 4) 일반적인 항암치료에서 나타나는 부작용으로

부터 정상 세포를 보호하기 위하여 약물 저항성 유전자를 도입하는 방법 등 다양한 전략이 제시되었다.<sup>4)</sup> 현재에는 그 활용기대범위가 더욱 확대되어 비유전적 질병인 AIDS나 암의 치료를 목적으로 활발한 연구가 진행중이다.<sup>5)</sup>(Table I)

유전자 치료요법에 필요한 시스템은 크게 유전자 발현계(gene expression system)와 유전자 수송계(gene delivery system)로 나눌 수 있다. 유전자 발현계란 치료 단백질의 생산 위치, 양, 기간 등을 암호화하는 유전자를 구성하는 플라스미드 DNA의 골격을 가지면서 유전자의 기능을 조절하는 것이고, 유전자 수송계는 표적 세포(또는 조직)로 유전자 발현계를 세포 주위로 접근시킴으로써 세포 표면 수용체(cell-surface receptor)에 의해 인식되도록 만들고 세포 내에서 그 운동을 조절하는데 이용되는 것이다.<sup>3,6)</sup>

성공적인 유전자 치료요법을 위해서는 우선 정상 세포에는 독성을 미치지 않고 특정 세포(예를 들면, 종양부위)에만 작용할 수 있도록 표적화할 수 있어야 하고, 표적세포에 충분히 많은 DNA를 효율적으로 수송할 수 있는 유전자 수송계와 DNA가 약리적인 효과를 나타내기 위해 충분한 내구력을 가지면서 높은 효율로 발현될 수 있는 유전자 발현계가 확립되어야 한다.<sup>1-8)</sup> 본 글에서는 표적성 유전자 수송계

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 02)880-8142, E-mail : cckim@plaza.snu.ac.kr

Table I—Candidate Diseases for Gene Therapy (Ref. 5)

Disease	Defect	Incidence	Target cells
<b>Genetics</b>			
Severe combined immunodeficiency (SCID/ADA)	Adenosine deaminase(ADA) in ~25% of SCID patients	Rare	Bone-marrow cells or T-lymphocytes
Haemophilia A	Factor VIII deficiency	1:10,000 males	Liver, muscle, fibroblasts or bone marrow cells
Haemophilia B	Factor IX deficiency	1:30,000 males	
Familial hypercholesterolaemia	Deficiency of low density lipoprotein(LDL) receptor	1:1 million	Liver
Cystic fibrosis	Faulty transport of salt in lung epithelium, Loss of CFTR gene	1:3,000 Caucasians	Airways in the lungs
Haemoglobinopathies: thalassaemias/sickle-cell anaemia	Structural defects in $\alpha$ or $\beta$ globin gene	1:600 in certain ethnic groups	Bone-marrow cells, giving rise to red blood cells
Gaucher's disease	Defect in the enzyme glucocerebrosidase	1:450 in Ashkenazi Jews	Bone-marrow cells, macrophages
$\alpha_1$ -antitrypsin deficiency: inherited emphysema	Lack of $\alpha_1$ -antitrypsin	1:3,500	Lung or liver cells
<b>Acquired</b>			
Cancer	Many causes (including genetic, environmental)	1 million/year in USA	Variety of carcinoma cell type; liver, breast, kidney, brain, pancreas
Neurological diseases	Parkinson's, Alzheimer's, spinal-cord injury	1 million Parkinson's and 4 million Alzheimer's patients in USA	Direct injection in the brain, neurons, glial cells, Schwann cells
Cardiovascular	Restinosis, arteriosclerosis	13 million in USA	Vascular endothelial cells, Arteries
Infectious diseases	AIDS, hepatitis B	Increasing numbers	T cells, macrophages, liver

(targeted gene delivery system)에 초점을 맞추어 이를 확립하기 위한 현재까지의 연구동향을 분석하고 앞으로의 개발 전략에 관하여 고찰하고자 한다.

### 현재까지의 연구동향

현재까지 진행되어 온 유전자 치료요법의 접근 분야를 크게 4가지로 나누어 살펴보면 다음과 같다.

첫째, *in vitro*계에서의 연구는 세포 내에서 발현되어 검출이 가능한 여러 가지의 표시 유전자(reporter gene, 예를 들면, CAT,  $\beta$ -galactosidase, luciferase, GFP, AP 등)과 수송체를 이용한 복합체로 세포주를 transfection시킨 후 효율을 관찰하는 방법이다. 이 방법은 현재까지 가장 많이 연구되었고 transfection 효율을 상당히 증가시키는 성과를 거둔 예들이 보고된 바 있다. 둘째, *ex vivo*계에서의 연구는 체내에서 세포를 제거한 후 수송체와 함께 배양하여 만든, 유전자를 도입한 세포(gene-engineered cell)를 몸 안에 다시 투여하는

방법을 이용한다. 이 방법은 주로 혈액 내에 있는 세포에 주로 이용되는데 세포를 제거한 후 다시 투여하기가 쉽기 때문이다. 셋째, *in situ*계에서의 연구는 수송체를 직접 비정상 세포에 이식하는 방법이다. 예를 들면, 낭포성 섬유증에 걸린 환자의 기관(trachea)과 기관지(bronchi)에 아데노바이러스를 주입하거나 근육 디스트로피(muscular dystrophia)에 걸린 환자의 근육에 디스트로핀 유전자(dystrophin gene)을 수송할 수 있는 수송체를 주입하는데 이용된다. 넷째, *in vivo*계에서의 연구는 혈류에 직접 중앙억제유전자(예를 들면, p53)와 수송체의 복합체를 주사하는 방법이다. 이 방법은 아직까지 임상적으로 긍정적인 효과를 거둔 예는 없지만 현재 중점적으로 연구되고 있기 때문에 보다 효과적인 수송체의 개발이 기대된다.<sup>9)</sup>

*In vivo*계에서 유전자 치료요법이 효과를 나타내기 위해서는 특정 세포에 대한 높은 선택성을 가져야 하고, 표적세포로의 유전자 수송효율이 좋아야 한다. 이것은 사용되는 수송체의 형태와 성질에 의존적인 양상을 보이는데, 현재까지 가

장 많이 연구되고 있는 수송체는 RNA/DNA 바이러스를 이용하는 바이러스성 수송체(viral vector)와 리포솜(liposome) 등을 이용한 비바이러스성 수송체(non-viral vector)이다.<sup>10)</sup>

**바이러스성 수송체 (Viral vector)**

유전자 수송계로서 바이러스성 수송체를 이용한 연구가 비바이러스성 수송체를 이용한 연구보다 훨씬 더 급속히 발전하였다. (지금까지 진행된 바이러스성 수송체에 대한 연구가 전체 연구의 85%에 달한다.)<sup>10)</sup> 바이러스성 수송체는 감염세포에 대한 transfection 효율이 비바이러스성 수송체에 비해 훨씬 높다는 장점이 있다. 하지만, 몇몇 바이러스성 수송체의 경우에는 상대적으로 작은 크기의 DNA만이 삽입될 수 있고, 숙주 면역 반응을 유발할 수 있으므로 반복투여를 했을 경우 유전자 발현 효율이 감소되는 한편, 바이러스의 성질에 의하여 다양한 형태의 세포에 표적화되므로 특정 세포에 대하여 특이적으로 유전자를 전달할 수 없다. 그 밖에도 바이러스성 수송체는 안전성이나 독성, 생산적인 측면에 있어서 문제점을 가지고 있는 것으로 알려져 있다.<sup>1-5,7,8,10)</sup> 현재 바이러스성 수송체에 많이 이용되고 있는 바이러스는 DNA 바이러스 중에서 아데노바이러스(adenovirus), 아데노조합 바이러스(Adeno-associated virus) 등이 있고, RNA 바이러스 중에서 레트로바이러스(retrovirus), 렌티바이러스(lentivirus) 등이 있으며, 이외에도 허피스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus), 휴먼 파포마 바이러스(human papova virus), 신드비스 바이러스(sindbis virus), 백신나 바이러스(vaccina virus) 등이 이용되고 있다.<sup>2,4,9)</sup>(Table II)

*아데노 바이러스 (Adenovirus)* - 아데노바이러스를 이용한 수송체는 바이러스성 수송체 중에서 가장 많이 연구되고

있는 분야이며 현재에는 암과 낭포성 섬유증에 대한 임상실험에 이용되고 있다. 아데노 바이러스를 이용한 수송체의 장점은 증식하는 세포나 활동하지 않는 세포에 상관없이 형질 전환시킬 수 있고 여러 조직에 대해서 특이성을 가지고 있으며 고농도에서 임상적으로 이용될 수 있는 물질들을 생산하는데 효과적인 계획(protocol)이 확립되어 있다는 점이다. 하지만, 아데노바이러스성 수송체는 유전자 발현이 일시적(transient)이라는 단점이 있고, 최근에는 아데노바이러스에 의해 야기되는 면역반응과 염증반응에 관계된 임상 시험에서 안전성 문제가 대두되고 있다.<sup>5,6,9,11-13)</sup>

*아데노 조합 바이러스 (Adeno-associated virus, AAV)* - 아데노 조합 바이러스는 단순하고 발병원이 없는(non-pathogenic) 단일 가닥의 DNA 바이러스이다. 아데노 조합 바이러스는 다양한 형태의 세포를 감염시킬 수 있는데 인간의 19 번 염색체에 선택적으로 결합한다는 특징이 있다. 그리고, 효과적인 형질도입을 위해서 아데노 조합 바이러스는 S기(S phase)에 있는 세포보다는 변화가 없는 환경의 세포를 선호한다. 아데노 조합 바이러스를 이용한 수송체는 최근 *in vitro*계에서 섬유아세포(fibroblast)를, *in vitro*계와 *in vivo*계에서 폐 상피 세포(lung epithelial cell)를 transfection시키는데 사용되었다고 보고되었다. 하지만, 아데노 조합 바이러스를 이용한 수송체는 생산성이 떨어지고 제조시 협조 바이러스(helper virus)가 필요하기 때문에 레트로 바이러스를 이용하는 수송체에 비하여 사용이 제한된다는 단점이 있다.<sup>2,5)</sup>

*레트로 바이러스 (Retrovirus)* - 레트로바이러스는 감염된 세포 내에서 RNA 게놈이 DNA로 변하는 바이러스의 일종이다. 레트로바이러스는 근육이나 뇌, 폐, 간 조직과 같은 비분열 세포를 감염시키지 못한다는 단점이 있다. 그래서 현재

**Table II-Comparison of Properties of Various Viral Vector Systems (Ref. 4, 5)**

Features	Maximum insert size	Integration into host genome	Advantages	Disadvantages
Adenovirus	~ 30 kb	No	• Transfects dividing, non-dividing cell	• Triggers immune response • Toxicity
Adeno-associated virus	3.5~4.0 kb	Yes	• Stable transfection • Site specific integration	• Small insert size
Retrovirus	7.0~7.5 kb	Yes	• Stable • Few immunological problems	• Transient expression • Insertional mutagenesis(?)
Lentivirus	7.0~7.5 kb	Yes	• Long expression • Few immunological problems	• Insertional mutagenesis(?)
Moloney murine leukaemia virus	~ 8 kb	Yes	• Stable transfection of dividing cells	• Transfects only rapidly dividing cells
Herpes simplex virus	~ 20 kb	No	• Large insert size • Neurone specificity	• Transient expression • Potential to generate infectious HSV in humans
Vaccinia	~ 25 kb	No	• Infects a variety of cells efficiently • Large insert size	• Limited to immunocompetent not vaccinated against smallpox

까지 대부분의 레트로바이러스를 이용한 연구는 *ex vivo*계에서 이루어지는 방식(표적세포를 체내에서 제거하여 *in vitro*계에서 배양시킨 다음 재조합 레트로바이러스 수송체로 형질전환시켜 다시 재이식하는 방식)을 통해 진행되었다.

한편, 레트로 바이러스 수송체는 숙주 세포의 게놈에 결합함으로써 유전자 발현을 긴 시간 유지할 수 있는 장점이 있다. 하지만, 이 과정이 특이성없이 이루어지기 때문에 종양유전자(oncogene)를 활성화시키거나 종양억제유전자(tumor suppressor gene)를 불활성화시킬 수 있는 가능성도 있다. 그리고, 레트로 바이러스 수송체는 다른 바이러스성 수송체에 비해 상대적으로 독성이 높다는 단점이 있다. 최근에는 레트로 바이러스를 리포솜에 봉입하는 방법을 이용하여 특정 세포로 표적화하는 연구가 진행 중이다.<sup>5,6,9,11,14)</sup>

**렌티 바이러스 (Lentivirus)** - 렌티 바이러스는 레트로 바이러스의 한 종류이지만 분열세포와 비분열세포 모두 감염시킨다는 특징이 있다. 가장 많이 알려진 렌티바이러스로는 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV)가 있다. 렌티바이러스가 일으키는 면역반응에 대해서는 알려진 바가 거의 없으나 몇 가지 조사에 의하면 다른 바이러스에 비하여 상대적으로 면역반응을 잘 유도하지 않는 장점이 있는 것으로 드러났다. 뿐만 아니라, 렌티바이러스는 설치류의 뇌, 간 근육, 눈 등에 주사하였을 때 6개월 이상 발현되었다는 결과가 보고되어 앞으로 *in vivo*계에서 지속성을 가지는 유전자 수송체로 개발될 가능성이 있다.<sup>9)</sup>

**허피스 심플렉스 바이러스 (Herpes simplex virus, HSV)** - 허피스 심플렉스 바이러스는 수송체로 활용될 수 있는 유전자를 80개 이상 함유하고 있는 상당히 큰 DNA 바이러스로 신경계 세포를 선택적으로 감염시킨다는 장점이 있다. 또한 허피스 심플렉스 바이러스는 뇌세포를 감염시키는 능력을 가지고 있는데 최근 막단백질(membrane protein)로

표적화할 수 있는 기능을 가진 변형 섬유(modified fiber)를 이용하여 표적화하는 방법이 연구되고 있다. 이러한 장점에 도 불구하고 허피스 심플렉스 바이러스는 독성이 매우 강하여 수송체로서의 사용이 제한되고 있다.<sup>5,9)</sup>

### 비바이러스성 수송체

바이러스성 수송체의 단점을 보완하기 위하여 비바이러스성 수송체에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 비바이러스성 수송체를 이용하는 유전자 수송계는 제조하기 쉽고, 크기에 상관없이 DNA를 수송할 수 있으며, 특정 세포에 표적화(targeting)하기 위하여 리간드(ligand) 또는 단일클론항체(monoclonal antibody)를 결합(coupling)하기 쉽다는 장점이 있는 반면, 바이러스성 수송체에 비하여 transfection 효율이 낮을 뿐만 아니라 *in vivo*계에서는 혈청 성분의 영향에 의해 그 효율이 더욱 떨어지는 단점이 있다. 현재 진행되고 있는 거의 대부분의 비바이러스성 수송체에 대한 연구는 특정 세포로의 표적화를 개선시키고 transfection 효율을 높이는 것, 그리고 혈청 존재 하에서도 안정한 수송체를 개발하는 것을 중점적으로 이루어지고 있다.<sup>1-10)</sup>(Figure. 1)

**리포솜 (liposome)** - 비바이러스성 수송체에 이용되는 방법 중에서 현재 가장 광범위하게 사용되는 물질이 바로 리포솜이다. 유전자 수송체로서 리포솜은 제조하기 쉽고, 플라스미드 DNA와 복합체를 형성하는 것이 용이하며 효소에 의한 DNA의 분해를 방어할 수 있는 장점이 있다. 이러한 리포솜은 세포 독성도 거의 나타나지 않아서 *in vivo*계에서의 활용이 기대되었으나 다른 비바이러스성 수송체와 마찬가지로 바이러스성 수송체에 비해 transfection 효율이 낮고 혈청 성분에 의해 transfection 활성이 상당히 감소한다는 단점 때문에 많은 성과는 거두지 못하고 있다. 하지만, DNA를 축합시킬 수 있는 물질(예를 들면, poly-L-lysine, protamine

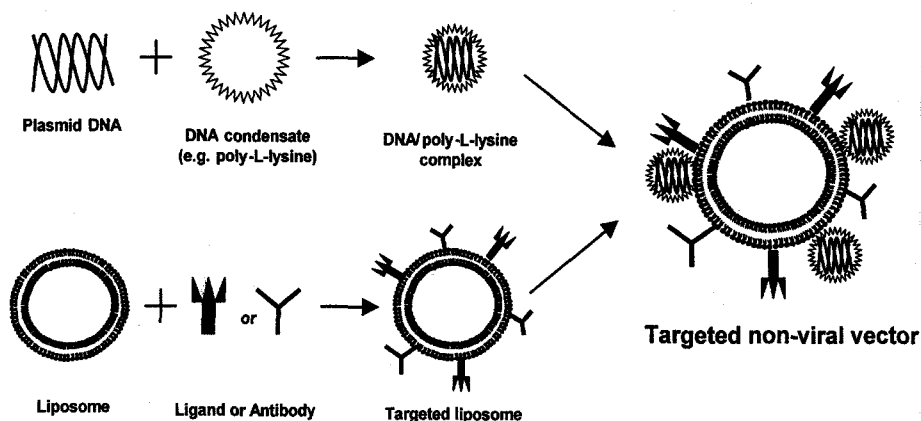


Figure 1-The general structure of a targeted non-viral vector

sulfate 등)이나 체내에서의 안정성을 높이는 물질(예를 들면, PEG series) 등을 첨가하여 이러한 단점들을 극복하려는 노력들이 활발히 진행되고 있다.<sup>15-17)</sup>

이러한 리포솜은 사용되는 지질의 성질에 따라 크게 양이온성 리포솜(cationic liposome)과 음이온성 리포솜(anionic liposome)으로 나눌 수 있으며 그 외에도 입체적으로 안정화시킨 리포솜(sterically-stabilized liposome), 용해성 리포솜(fusogenic liposome), pH 감응성 리포솜(pH-sensitive liposome), 온도 감응성 리포솜(thermosensitive liposome), 면역 리포솜(immunoliposome) 등이 있다.<sup>18)</sup>

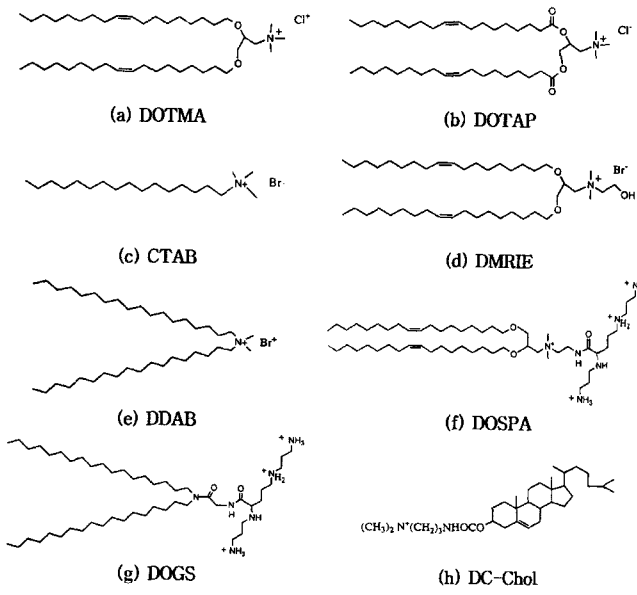
양이온성 리포솜 (Cationic liposome) – 리포솜을 제조하는데 있어서 양이온성 지질(Figure. 2)과 협조 지질(helper lipid: liposome/DNA 복합체를 안정화시키는 역할을 하는 것으로 DOPE, DOPC, Cholesterol 등이 있다.)을 사용하는 양이온성 리포솜은 제조가 쉽고 (-)로 하전되어 있는 DNA와 쉽게 복합체를 형성할 수 있으며, 독성이 거의 없기 때문에 현재 가장 많이 연구되고 있는 비바이러스성 수송체 중의 하나이다. 리포솜은 extrusion, freeze drying, sonication, french press technique, detergent dialysis technique 등으로 제조할 수 있는데, 물리적인 구조에 따라 크게 small unilamellar vesicle(SUV), intermediate sized uni-lamellar vesicle (IUV), large unilamellar vesicle(LUV), multilamellar vesicle (MLV) 등으로 나눌 수 있다.

1987년 *in vitro*계에서 DOTMA와 DOPE를 사용한 연구가 시작된 이후로 양이온성 리포솜은 *in vitro*계 뿐만 아니라 *ex vivo*계, *in vivo*계에서도 적절하게 이용될 수 있으며 (Table. III), 특히 DC-Chol/DOPE를 이용한 양이온성 리포솜의 경우에는 낭포성 섬유증(cystic fibrosis)나 흑색종(melanoma)을 치료하는 임상실험에서 수송체로 성공적으로 이용되고 있다. 현재 제제화되어 연구에 이용되고 있는 양이온성 리포솜으로는 Lipofectin, Lipofectace, Lipofeamine, Lipotaxi, Transfectam, Transfectin 등이 있다. 이처럼 양이온성 리포솜이 *in vitro*계에서부터 *in vivo*계에 이르기까지 광범위하게 이용되고 있음에도 불구하고 DNA를 세포에 전달하는 기전은 아직까지 확실하게 밝혀지지 않고 있다. 하지만 현재에는 1) 엔도사이토시스에 의한 수송 또는 2) 세포막을 융해시킴(plasma membrane fusion)으로써 내용물을 세포질까지 전달한다는 두 가지의 논리가 지배적이다.(Figure. 3)

이러한 양이온성 리포솜의 transfection 효율에 영향을 미치는 인자로는 1) 양이온성 지질의 구조 및 특성 2) 양이온성 리포솜의 조성 3) 리포솜의 형태 4) 리포솜/DNA의 전하비 5) 리포솜/DNA 복합체의 크기 6) 리포솜과 DNA의 반응 시간 등이 있다.<sup>19-28)</sup>(Table. IV)

음이온성 리포솜 (Anionic liposome) – 양이온성 리포솜의 경우에는 안정성에 한계를 가지고 있고 효능이 낮으며 (+) 이온에 의한 독성이 나타날 수 있는 반면, 음이온성 리포솜은 보다 안정하며 독성이 거의 없는 것으로 나타났다. 음이온성 리포솜은 (-)로 하전되어 있기 때문에 DNA를 봉입하는 기술이 발달하였는데 최근까지 역상증발법(reverse phase evaporation)이 많이 사용되었으나, 대량 제조시 적절하지 못하기 때문에 LUV를 사용하기도 한다.(규모가 큰 과정에서는 freeze/thaw, extrusion 방법이 적절하다는 내용도 보고된 바 있다.) 현재 음이온성 리포솜에 대한 연구는 주로 리포솜 내부에 대한 DNA의 봉입효율을 높이는 방법과, 봉입한 후 리포솜을 extrusion시키는 동안에도 DNA가 손상되지 않고 생리적 활성을 가질 수 있는가에 대한 부분을 중심으로 논의가 진행되고 있다. 하지만, 이러한 음이온성 리포솜이 극복해야 할 궁극적인 부분은 세포막도 (-)로 하전되어 있고 리포솜 자체도 (-)전하를 띠고 있는데 어떠한 방법을 통해 봉입한 DNA를 특정 세포에 표적화하여 효과적으로 전달할 수 있는가의 문제이다.<sup>37,38)</sup>

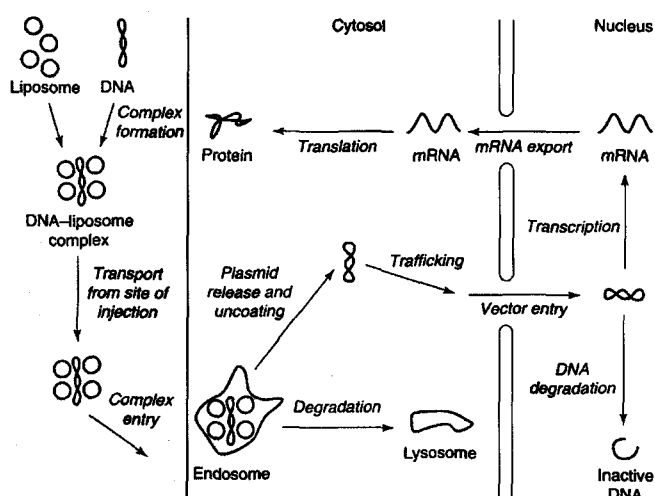
입체적으로 안정화시킨 리포솜 (Sterically-stabilized liposome, SSL) – 표면에 당단백이나 에틸렌 글리콜에 결합된



**Figure 2**–The structure of some cationic lipids used in gene delivery vectors. Abbreviations; DOTMA, N-(2,3-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride; DOTAP, 1,2-dioleoyloxypropyl-N,N,N-trimethylammonium chloride; CTAB, cetyltrimethylammonium bromide; DMRIE, 1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethylhydroxylammonium bromide; DDAB, dimethyl-dioctadecylammonium bromide; DOSPA, 2,3-dioleoyloxy-N-2-(sperminecarboxamido)ethyl-N,N-dimethyl-1-propanammonium; DOGS, dioctadecylamidoglycylspermine, DC-Chol, 3-β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)carbonyl]cholesterol.

**Table III—Application of Cationic Liposome-mediated Gene Delivery in vivo**

Tissues or cells	Liposome composition	Species	Genes	Reference
Hepatocyte	EPC/Chol	Mice, Rat	Asialofetuin	Jian Wu <i>et al</i> <sup>29)</sup>
Mouse colon tumor, Fibrosarcoma, Bladder carcinoma	DC-Chol	Mice	pCMV-luc interferon- $\gamma$	T Nomura <i>et al</i> <sup>71)</sup>
Various organ	Lipofectamine <sup>TM</sup>	Balb/C mice	Alkaline Phosphatase	Hans E. J. Hofland <i>et al</i> <sup>30)</sup>
Porcine artery	GAP-DLRIE/DOPE	Yorkshire Pig	pCMV-CAT	Dominique J. Stephan <i>et al</i> <sup>31)</sup>
Lung	DC-Chol/DOPE GLB43,73,84,221,253 /DOPE	Mice	$\beta$ -galactosidase	Christine Guillaume-Gable <i>et al</i> <sup>32)</sup>
Lung Sera	DOTIM/Chol	Female CD1 mice	G-CSF,pM75.6, D <sub>5</sub> W G-CSF,pMB75.6, D <sub>5</sub> W	Molly Mcclarrinon <i>et al</i> <sup>33)</sup>
Various tissue	DDAB/DOPE/PEG-PE	Female CD1 mice	Luciferase	Brigitte Sternberg <i>et al</i> <sup>34)</sup>
Myoblast (Muscle cell)	TMAG/DOPE	New born rat	pRSV-luc pRSV-lacZ	Hisanori Kojima <i>et al</i> <sup>35)</sup>
Neuron	DOGS	Adult female Sprague-Dawley rat	pCAGGSBPV	Takachi Imaoka <i>et al</i> <sup>36)</sup>



**Figure 3**—Schematic representation of cationic liposome-mediated gene delivery (Ref. W.C. Tseng and L. Huang, Liposome-based gene therapy, *Recent advances in gene and drug delivery symposium in september 1999*).

The intracellular events from the formation of the DNA-liposome complex to protein synthesis consist of five major anatomical stages: complex formation; entry across the cell membrane; release from the endosome; entry into the nucleus; and the activity inside the nucleus.

Cationic liposome condenses DNA to form the complex by charge neutralization. Subsequently, cells incorporate the complex primarily by endocytosis.

Destabilization of endosomal membranes is required to release delivered plasmid intracellularly before lysosomal digestion of the plasmid. Freed plasmid enters the nucleus to start transcription activity depends on the vector construct.

지질을 가지고 있는 SSL은 기존의 리포솜에 비해 혈중에서 100배 정도 더 오래 머무르면서 치료효과를 높일 수 있도록

개발되었다. 실제로 이 리포솜을 이용하였을 때 간이나 비장에 의한 흡수가 상당히 감소하였다는 보고가 있다. 이처럼 체내에서 안정성이 증가된 이유는 입체적인 방해작용을 통해 혈장 단백질과 세포 표면 사이의 반응을 저해했기 때문이다. 하지만, 이러한 리포솜은 그들이 체내에서 머무를 수 있는 시간만큼 표적 장기가 아닌 다른 조직으로 분포될 확률도 높다는 것으로 나타났다.<sup>39-42)</sup>

용해성 리포솜 (Fusogenic liposome) - 비바이러스성 수송체가 세포 내로 들어가서 유전자를 발현시키기 위해서는 몇 가지 과정을 거치게 되는데, 그 중에서 세포막을 용해시킴으로써 transfection 효율을 높이는 리포솜이 바로 용해성 리포솜이다. 센다이 바이러스(sendai virus)로 코팅한 리포솜의 경우에는 포유류 중 거의 모든 종류의 세포막을 쉽게 용해시킬 수 있는 능력을 가지고 있기 때문에 transfection 효율을 증가시킨다는 보고가 있다. 이러한 용해성 리포솜은 독성이 없어서 인체에 무해할 뿐 아니라 혈액 세포(blood cell)에 선택적으로 표적화할 수 있는 장점이 있다. 이러한 성질을 가지는 물질로는 인플루엔자 바이러스 당단백(influenza virus glycoprotein), 락토실세라미드(lactosylceramide), nigericin 등이 있다. 하지만, 용해성 리포솜은 정량적으로 DNA를 함유하는 능력이 떨어진다는 단점이 있어서 임상실험에 대한 연구는 상대적으로 거의 이루어지지 않고 있다.<sup>43,44)</sup>

pH 감응성 리포솜 (pH-sensitive liposome) - 수송체가 세포 내에 들어간 후 엔도솜(endosome)과 리소솜(lysosome)을 경유하는 동안 수송체가 산성화된다는 사실이 밝혀진 다음 세포질로의 수송을 촉진시킬 수 있는 수송체로서 pH 감응성 리포솜이 개발되었다. pH 감응성 리포솜은 엔도솜의 산성

**Table IV**—Influential Factors in Cationic Liposome-mediated Gene Delivery Systems (Ref. 3)

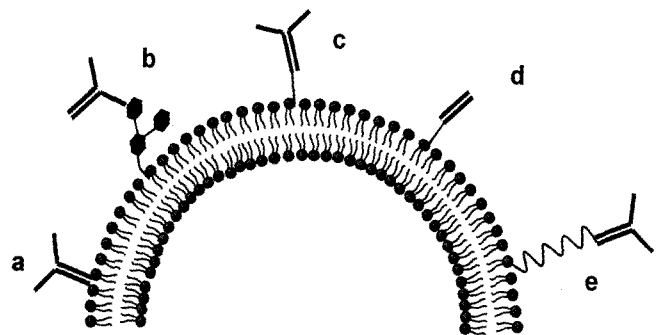
	Characteristics	Affecting factors
<i>Physicochemical characteristics</i>	size, shape, charge and stability	ionic strength, lipid composition, lipid/DNA ratio, concentration, and mixing procedures
	DNA plasmid	physical form, promoter/enhancer, cDNA and introns
	cationic lipid	lipid anchor, linker and cationic head group
	target organ	mode of delivery and degree of vascularization
<i>Transfection</i>	adhesion to cell surfaces	adsorption or recognition by receptors
	cellular internalization	endocytosis, fusion or entry through cell membrane pores
	DNA release	endosomal, lysosomal or cytoplasmic
	nuclear trafficking	passive diffusion, active transport or fusion
	stability	plasma or other biological milieus
<i>In vivo characteristics</i>	pharmacokinetics and biodistribution	target organs vs. non-target organs, plasma half-life, excrete rate
	efficacy	level and duration of gene expression
	toxicity	cellular and systems
<i>Manufacturing issues</i>	reproducibility: sterility	aggregation vs. stable colloidal suspension
	impurity	endotoxin, chemical degradation
	shelf-life stability:scalability	suspension vs. lyophilized products

pH(pH5~6.3)에서 표면이 불안정하게 되어 안의 내용물을 세포질로 쉽게 방출할 수 있다. 뿐만 아니라 종양 세포 주위의 pH가 다른 정상세포 보다 낮은 성질을 이용하여 리포솜이 낮은 pH에서 약하게 만들면 특정 부위로의 표적화도 가능하다.<sup>18,45)</sup>

**온도 감응성 리포솜 (Thermosensitive liposome)** – 온도 감응성 리포솜은 37°C 이상의 온도에 민감하기 때문에 암 세포 주위의 온도가 42~45°C 정도 되는 성질을 이용하여 특정 세포로 표적화할 수 있다. 하지만 보다 작고 깊숙한 곳에 위치하여 접근하기 힘든 종양에 표적화하기 위해서는 보다 강력한 온도 감응 장치가 개발되어야 한다.<sup>18)</sup>

**면역리포솜 (Immunoliposome)** – 면역리포솜은 특정 세포의 표면 항원을 인식하는 항체를 표면에 부착하여 표적화하는 리포솜이다. 실제로 면역글로불린 G(Ig G)를 리포솜에 끼워 넣어 종양 세포로의 표적화 수송을 가능하게 한 연구가 보고된 바 있다. 하지만, 면역리포솜은 체내 순환계를 통해 이동하는 동안 크기가 너무 커진다는 단점이 있다.<sup>18,57,65)</sup> (Figure. 4)

**에멀전 (Emulsion)** – 현재 가장 많이 연구되고 있는 비바 이러스성 수송체는 양이온성 리포솜이지만, 양이온성 리포솜 이 매개하는 유전자 수송계는 높은 농도에서 리포솜이 거대 한 응집체를 형성한다는 것과 혈청에 대한 민감성이 있어서 혈청 성분에 의해 transfection 활성이 저해될 가능성이 있다는 문제점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 양이온성 에멀전이 개발되었다. 제형에 비이온성 계면활성제를 첨가함



**Figure 4**—The structure of immunoliposomes. (Ref. 57) Antibodies may be attached to liposomes using a variety of techniques. These methods include: (a) surface adsorption (b) hapten binding (c) covalent coupling of whole immunoglobulin or (d) Fab' (e) PEG spacers.

으로써 거대 응집체 형성을 억제하고 보다 안정한 양이온성 에멀전/DNA 복합체를 얻었다. 이러한 복합체는 양이온성 리포솜에 비해 transfection 효율을 1.5~3배 정도 증가시켰고, 20% 혈청 하에서 효율이 거의 감소하지 않았다. 이러한 사실로 에멀전 제형이 유전자 수송계로서 기존의 양이온성 리포솜에 비해 더 좋은 물리적/생리적 활성을 가지는 것으로 보인다.<sup>46-48)</sup>

**고분자성 물질 (Polymer)** – 양이온성 지질 이외에도 poly-ethylenimine, polylysine, polyornithine, polyamidoamine dendrimers, poly(2-dimethylamino)ethyl methacrylate (PDMAE MA) 등과 같은 고분자성 물질이 비바이러스성 수송체를 제

조하는데 많이 이용되고 있다. 이러한 고분자 물질은 양이온성 지질에 비해서 세포질에서 핵으로의 유전자 수송을 촉진하고 플라스미드 DNA를 효과적으로 축합시킬 수 있기 때문에 transfection 효율을 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다. 하지만 몇몇 연구에서는 고분자성 물질만을 사용했을 경우 transfection 효율이 감소했고, 이러한 문제는 지방 친화적 성분(lipophilic components)에 의해 개선된다는 결과가 보고되었다. 그래서, 최근에는 양이온성 고분자 물질을 이용하여 플라스미드 DNA를 축합시킨 다음 양이온성 리포좀과 복합체를 이루어 비바이러스성 수송체로 사용하는 방법이 많이 연구되고 있다. 한편, 이러한 고분자 물질을 사용할 경우에는 화학적 물리적 분해 과정에 의하여 수상 용액에서 안정성이 감소하기 때문에 이를 극복하기 위하여 freeze drying 또는 freeze thawing 방법을 사용한다.<sup>49-56)</sup>

### 수송체의 표적화를 개선시키는 방법

유전자 치료요법에 있어서 성과를 거두기 위해서는 유전자 수송 효율 및 발현 효율이 높아야 하지만, 특정 세포로의 표적화 역시 중요한 문제이다. 왜냐하면, 유전자 수송과정에서 수송체가 종양 부위와 같은 특정세포로 표적화되지 않는다면, 정상 세포의 성분을 변질시키거나 독성을 나타내는 등 부작용을 유발하여 환자의 치료에 악영향을 미칠 수도 있기 때문이다. 그래서, 최근에는 수송체를 리간드(ligand)나 단일 클론 항체(monoclonal antibody) 등으로 수식하여 특정 세포로 표적화하는 방법에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

현재까지 유전자 수송체를 수식하는 리간드로 사용되는 것들에는 여러 가지가 있는데 크게 1) 올리고핵산염(oligonucleotide) 2) 탄수화물(carbohydrate) 3) 펩타이드(peptide) 4) 수용체 리간드(receptor-ligand) 5) 항체(antibody)

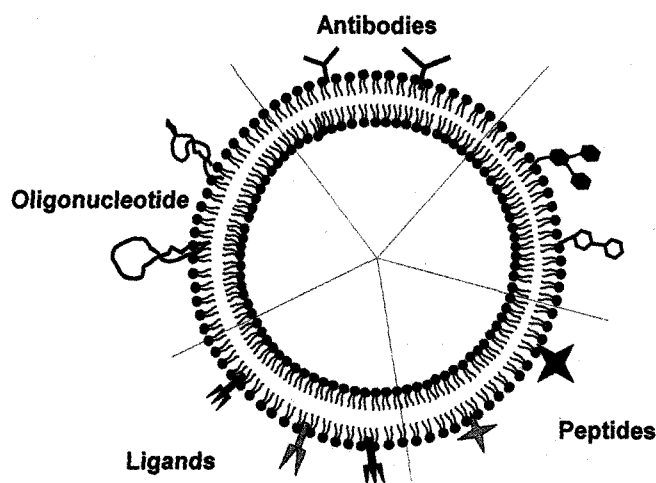


Figure 5—Site-directing ligands and targeting approaches. (Ref. 57)

등으로 나눌 수 있다. (Figure. 5) 그 중에서 가장 많이 이용되는 방법이 수용체 표적화(receptor-targeting) 방법과 항체 표적화(antibody-targeting) 방법이다.

**수용체 표적화 방법 (receptor targeting)**—수용체 표적화 방법이란 특정 세포에 있는 수용체와 결합할 수 있는 리간드를 부착하여 표적화하는 방법으로서 현재 많이 사용되는 리간드에는 asialoglycoprotein, 엽산(folic acid), 트랜스페린(transferrin), 성장인자, 각종 호르몬 등이 있다.(Table. V)

**항체 표적화 방법 (antibody-targeting)**—항체 표적화 방법이란 수용체 표적화 방법과 비슷하게 특정 세포가 가지고 있는 자가항원에 대한 항체를 수송체에 부착함으로써 표적화하는 방법이다. 이와 같이 유전자 치료요법에서 항체 유전공학을 적용하는 목적은 1) 보다 나은 형질전환을 위하여 바이러스성 수송체의 방향성(tropism)을 재정립하고 2) 암세포나 질병에 감염된 세포를 죽이기 위하여 면역계의 효과기 세

Table V—Ligand Used as Molecular Conjugates for Targeted DNA Delivery and Current Disease Applications (Ref. 11)

Ligand	Target cell/Organ	Disease
Asialoorosomuroid	hepatocyte/liver	analbuminemia, phenylketonuria, hemophilia, and other metabolic disorders
Transferrin	liver, lung, and many others	melanoma, and many other applications
Folate	cancer cells; KB, Hela	ovarian cancer
Adenovirus fiber	liver, lung, and many others	lung cancer, phenylketonuria, hemophilia, and many others
Malaria cs protein	hepatocyte/liver	hepatocellular carcinoma, diabetes cirrhosis
Epidermal growth Factor	lung, brain, and Pancreatic cancer cells, other types of cancer cells	lung, brain, pancreatic cancer cells, and other types of cancer cells
Human papilloma Virus capsid	epithelial cells/cervix	cervical cancer
Fibroblast growth	brain	brain cancer



포(effector cell)에 새로운 세포 감지 능력을 부여하며 3) 항체에서 나온 분자의 세포 내 발현을 통해 질병에 감염된 세포나 바이러스의 기능을 저해시키기 위함이다.

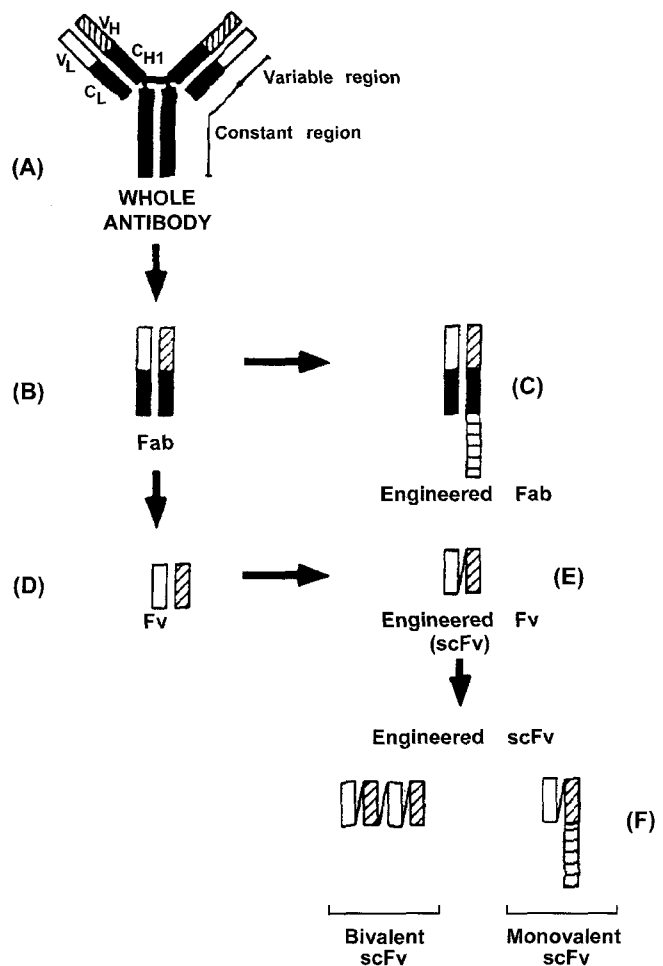
실제로 단일 클론 항체를 이용한 유전공학은 1) 다양한 수송체의 세포 표적화 2) 세포에 대한 새로운 결합 능력 제공 3) 세포/바이러스의 기능 억제를 위한 작은 항체가 세포 내에서 발현 4) 치료 항체가 장시간동안 전신에서 만들어질 수 있게 하는 등 상당히 많은 이점들을 주고 있다. 이외에도 생체 내에서 B-세포가 아닌 다른 세포들에 의한 치료 단일 클론 항체의 전신 수송을 목적으로 하는 등 최근 단일 클론 항체를 이용한 연구들이 다양하게 진행되고 있다.<sup>63-65)</sup>

### 앞으로의 개발전략

많은 문제점이 있음에도 불구하고 유전자 치료요법에 대한 연구는 *in vitro*계에서부터 *in vivo*계, 임상실험에 이르기 까지 광범위한 영역에서 급속하게 발전해 왔다. 지금 연구되고 있는 많은 제형들이 *in vitro*계에서는 효과적이지만, *in vivo*계에서는 긍정적인 성과를 얻지 못하고 있다. 왜냐 하면, 세포 배양 모델은 *in vivo*계에서의 유전자 수송을 위한 많은 생리학적인 인자들을 그대로 반영하지 못하기 때문이다. 예를 들면, *in vitro*계에서의 세포 증식, 표면적, 전하 밀도, 표면 수용체의 이용가능성, 배양된 세포의 엔도사이토시스를 위한 친화성 등이 *in vivo*계와는 다를 것이다. 그리고 *in vitro*계는 표적세포로 투여된 플라스미드 DNA의 생체이용률에 영향을 미치는 속도 제한 인자(rate-limiting factor)를 생성하지 못한다. 다시 말해서 *in vivo*계에서 플라스미드 DNA의 유전자 발현은 제형을 만들기 위한 약제학적 문제점, 낮은 생체이용률, 물리화학적 성질의 변화, 빈약한 세포 내 유동 등과 같은 다양한 인자에 의해 저해되는 것이다.

이러한 유전자 치료요법의 문제점들을 극복하기 위하여 많은 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 예를 들면, 핵으로의 수송과 유전자 발현을 촉진하기 위해서 바이러스성 핵 전달 신호(viral nuclear translocation signal)를 이용하는 방법이 연구되고 있고 특이성을 높이기 위해서 조직 특이적인 조절 프로모터(tissue specific, regulatable promotor)를 사용하기도 한다. 뿐만 아니라, 엔도솜으로부터의 방출을 증가시키기 위하여 엔도솜을 용해시키는 물질(endosomal lysis agent) 또는 엔도솜을 우회하는 물질(bypass agent)을 이용하거나 강력한 치료 유전자로 유전자 발현율을 높이려는 연구도 있다.(Figure. 7)

최근부터 제안되고 있는 유전자 치료요법의 개발전략으로



**Figure 6**—Structure of engineered antibodies. (Ref. 63) Antibodies(150 kDa) are bivalent tetrameric molecules made up of two identical heavy and two identical light chains. They contain two small variable (V) region, which are responsible for antigen binding, and a large constant region (C), which confers effector functions and stability in biological fluids (A). Fab fragments (50 kDa) are monovalent molecules consisting of the variable region plus the light chain constant region and the first domain of the heavy chain constant region (B). They can be cloned and expressed in bacteria and eukaryotic cells. They can also be further engineered for grafting of additional functions (C). The shortest variable fragment is called Fv (25 kDa) (D). V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains can be linked by a short flexible peptide linker to form scFvs (27 kDa) (E). scFvs can also be further engineered to form bivalent molecules showing different antigens; see Plucktun and Pack, 1997) or to graft additional activities (F).

는 1) 바이러스성 수송체와 비바이러스성 수송체를 동시에 사용함으로써 치료효과를 높이는 방법 2) 사이토킨(cytokine: 예를 들면, interleukin series, interferon series 등)을 리포솜에 첨가하여 백신으로 개발하는 방법 3) gelatin 등을 이용하여 나노스피어를 형성함으로써 제어형 유전자 수송체를 제조하는 방법 등이 있다.<sup>66-73)</sup>

## 문 헌

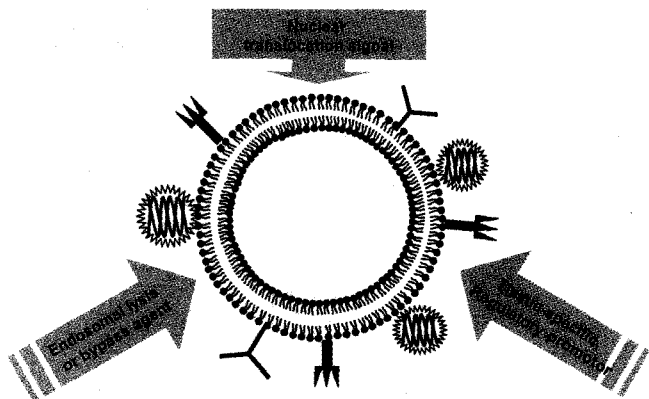


Figure 7-The structure of an ideal non-viral vector (Ref. 6, 10)

## 결 론

이상에서 유전자 수송체로 사용될 수 있는 수송체의 특징과 종류, 그리고 이러한 수송체를 특정 세포에 표적화시키는 방법에 대한 현재까지의 연구동향 및 개발전략에 대해서 살펴보았다. 유전자 수송체로 사용될 수 있는 수송체는 크게 바이러스성 수송체와 비바이러스성 수송체가 있는데, 바이러스성 수송체는 transfection 효율은 높지만 안정성, 독성, 면역원성 등의 문제점이 있는 반면 비바이러스성 수송체는 제조가 쉽고 독성이 적다는 장점이 있지만 transfection 효율이 상대적으로 낮은 편이다. 비바이러스성 수송체 중에서 가장 많이 이용되고 있는 것은 양이온성 리포솜인데, 현재에는 양이온성 리포솜의 transfection 효율을 높이고 혈청 존재 하에서 안정한 수송체를 개발하기 위하여 고분자성 물질로 플라스미드 DNA를 축합시킨 다음 폴리에틸렌 글리콜로 수식하는 방법들이 많이 연구되고 있다. 뿐만 아니라, 특정 세포로의 표적화를 향상시키기 위하여 다양한 리간드로 수송체를 수식하는 방법이 연구되고 있는데, 최근에는 단일 클론 항체를 이용하여 표적화하는 방법이 바이러스성 수송체와 비바이러스성 수송체 모두에 적용되어 연구되고 있다.

앞으로 유전자 치료요법의 개발전략을 수립하는데 있어서 중요한 문제는 제조 방법이 쉽고, 인체에 무해하며 안전하게 유전자를 수송할 수 있는 수송체를 이용하여 유전자 치료요법의 궁극적인 목적인 장시간 유전자 발현을 이루어 내는가 하는 문제가 관건이다. 이러한 목적을 달성하기 위해서는 수송체의 물리화학적, 약물동력학적 성질-예를 들면, 입자의 크기, 기하학, 전하 밀도, 리간드의 친화성과 배치, 세포 내 유동 등을 철저히 고려한 연구가 진행되어야 할 것이다.

- 1) J. Smith, Y. Zhang and R. Niven, Toward development of a non-viral gene therapeutics, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **26**, 135-150 (1997).
- 2) E. Tomlinson and A.P. Rolland, Controllable gene therapy Pharmaceuticals of non-viral gene delivery systems, *J. Control. Rel.*, **39**, 357-372 (1996).
- 3) R. I. Mahato, A. Rolland and E. Tomlinson, Cationic lipid-based gene delivery systems: Pharmaceutical perspectives, *Pharm. Res.*, **14**, 853-859 (1997).
- 4) M. Bower and J. Waxman, Gene therapy for prostate cancer, seminars in *Cancer Biology*, **8**, 3-9 (1997).
- 5) I.M. Verma and N. Somia Gene therapy: promises, problems and prospects, *Nature*, **389**, 239-242 (1997).
- 6) K.W. Peng, Strategies for targeting therapeutic gene delivery, *Mol. Med. Today*, **5**, 448-453 (1999).
- 7) G.U. Dachs, G.J. Dougherty, I.J. Stratford and D.J. Chaplin, Targeting Gene Therapy to Cancer: A Review, *Onc. Res.*, **9**, 313-325 (1997).
- 8) J.A. Roth and R.J. Cristiano, Gene therapy for cancer: What have we done and where are we going?, *J. Natl. Cancer I.*, **89**, 21-39 (1997).
- 9) W.F. Anderson, Human gene therapy, *Nature*, **392**, 25s-30s (1998).
- 10) R.J. Cristiano, Targeted, non-viral gene delivery for cancer gene therapy, *Front. Biosci.*, **15**, 1161-1170 (1998).
- 11) L.L. Nielsen and D.C. Maneval, p53 tumor suppressor gene therapy for cancer, *Cancer Gene Ther.*, **5**, 52-63 (1998).
- 12) B.J. Mehrara, P.B. Saadeh, D.S. Steinbrech, M. Dudziak, J.A. Spector, J.A. Greenwald, G.K. Gittes and M.T. Longaker, Adenovirus-mediated gene therapy of osteoblasts *in vitro* and *in vivo*, *J. Bone. Miner Research*, **14**, 1290-1301 (1999).
- 13) K. Kasono, J.L. Blackwell, J.T. Douglas, I. Dmitriev, T.V. Strong, P. Reynolds, D.A. Kropf, W.R. Carroll, G.E. Peters, R.P. Bucy, D.T. Curiel and V. Krasnykh, Selective gene delivery to head and neck cancer cells via an integrin targeted adenoviral vector, *Clin. Cancer Res.*, **5**, 2571-2579 (1999).
- 14) T.M. Pakkanen, M. Laitinen, M. Hippelainen, H. Kallionpaa, P. Lehtolainen, P. Leppanen, J.S. Luoma, R. Tarvainen, E. Alhava and S. Yla-Herttuala, Enhanced plasma cholesterol lowering effect of retrovirus-mediated LDL receptor gene transfer to WHHL rabbit liver after improved surgical technique and stimulation of hepatocyte proliferation by combined partial liver resection and thymidine kinase-ganciclovir treatment, *Gene Ther.*, **6**, 34-41 (1999).
- 15) A.R. Thierry, Y. Lunardi-Iskandar, J.L. Bryant, P. Pabinovich, R.C. Gallo and L.C. Mahan, Systemic gene therapy : Biodistribution and long-term expression of a transgene in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)*, **92**, 9742-9746 (1995).
- 16) J.C. Birchall, I.W. Kellaway and S.N. Mills, Physico-chemical characterization and transfection efficiency of lipid-based gene delivery complexes, *Int. J. Pharm.*, **183**, 195-207 (1999).

- 17) M. Ruponen, S. Yla-Herttuala and A. Urtti, Interactions of polymeric and liposomal gene delivery systems with extracellular glycosaminoglycans: physicochemical and transfection studies, *Biochim. Biophys. Acta*, **1415**, 331-341 (1999).
- 18) C.R. Dass, T.L. Walker, M.A. Bourton and E.E. Decruz, Enhanced anticancer therapy mediated by specialized liposomes, *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 972-975 (1997).
- 19) X. Gao and L. Huang, A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **179**, 280-285 (1991).
- 20) K. Son, F. Sorgi, X. Gao and L. Huang, Cationic Liposome-Mediated Gene Transfer to Tumor Cells in Vitro & in Vivo, *Method in Molecular Medicine, Gene Therapy Protocols*, 329-337 (1997).
- 21) P.C. Ross, M.L. Hensen, R. Supabphol and S.W. Hui, Multilamellar cationic liposomes are efficient vectors for *in vitro* gene transfer in serum, *J. Liposome Res.*, **8**, 499-520 (1998).
- 22) D.L. Reimer, S. Kong, M. Monck, J. Wyles, P. Tam, E.K. Wasan and M.B. Bally, Liposomal lipid and plasmid DNA delivery to B16/BL6 tumors after intraperitoneal administration of cationic liposome DNA aggregates, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**, 807~815 (1999).
- 23) P. Pires, S. Simoes, S. Nir, R. Gaspar, N. Duzgunes and M.C.P Lima, Interaction of cationic liposomes and their DNA complexes with monocytic leukemia cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1418**, 71-84 (1999).
- 24) A. Helbling-Leclerc, D. Scherman and P. Wils, Cellular uptake of cationic lipid/DNA complexes by cultured myoblasts and myotubes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1418**, 165-175 (1999).
- 25) L.G. Barron, K.B. Meyer and F.C. Szoka, Effects of complement depletion on the pharmacokinetics and gene delivery mediated by cationic lipid-DNA complexes, *Hum. Gene Ther.*, **9**, 315-323 (1998).
- 26) D.V. Schaffer and D.A. Lauffenburger, Optimization of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery, *Biol. Chem.*, **273**, 28004-28009 (1998).
- 27) E.L. Romero, M. Morilla, J. Regts, G.A. Koning and G.L. Scherphof, On the mechanism of hepatic transendothelial passage of large liposomes, *FEBS Lett.*, **448**, 193-196 (1999).
- 28) G. Thurston, J.W. McLean, M. Rizen, P. Baluk, A. Haskell, T.J. Murphy and D. Hanahan, Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice, *J. Clin. Invest.*, **101**, 1401-1413 (1998).
- 29) J. Wu, P. Liu, J.L. Zhu, S. Maddukuri and M.A. Zern, Increased Liver Uptake of Liposome and Improved Targeting Efficacy by Labeling With Asialofetuin in Rodents, *Hepatology*, **27**, 772-778 (1998).
- 30) H.E.J. Hofland, D. Nagy, J. Liu, K. Spratt, Y.L. Lee, O. Danos and S.M. Sullivan, In vivo Gene transfer by intravenous administration of stable cationic lipid/DNA complex, *Pharm. Res.*, **14**, 742-749 (1997).
- 31) D.J. Stephan, Z.Y. Yang, H. San, R.D. Simari, C.J. Wheeler, P.L. Felgner, D. Gordon, G.J. Nabel and E.G. Nabel, A new cationic liposome DNA complex enhances the efficiency of arterial gene transfer in mice, *Hum. Gene Ther.*, **7**, 1803-1812 (1996).
- 32) C. Guillaume-Gable, V. Floch, B. Mercier, M.P. Audrezet, E. Gobin, G.L. Bolch, J.J. Yaouang, J.C. Clement, H.D. Abbayes, J.P. Leroy, V. Morin, and C. Ferec, Cationic phosphonolipids as nonviral gene transfer agent in the lungs of mice, *Hum. Gene Ther.*, **9**, 2309-2319 (1998).
- 33) M. Molly, G. Leslie, W. Virginia, F. Bryan, B. Clayton, F. Lee, L. Denny, R. Lisa, B.B. Lee, F. Ed, and G. Cornelia, In vivo studies of gene expression via transient transgenesis using lipid-DNA delivery, *DNA. Cell Biol.*, **18**, 533-547 (1999).
- 34) B. Sternberg, K. Hong, W. Zheng and D. Papahadjopoulos, Ultrastructure characterization of cationic liposome-DNA complexes showing enhanced stability in serum and high transfection activity in vivo, *Biochim. Biophys. Acta*, **1375**, 23-35 (1998).
- 35) H. Kojima, N. Ohishi, M. Takamori and K. Yagi, Cationic multilamellar liposome-mediated gene transfer into primary myoblasts, *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **207**, 8-12 (1995).
- 36) T. Imaoka, I. Date, T. Ohmoto, and T. Nagatsu, Significant behavioral recovery in parkinson's disease model by direct intracerebral gene transfer using continuous injection of a plasmid DNA-liposome complex, *Hum. Gene Ther.*, **9**, 1093-1102 (1998).
- 37) P. Schoen, L. Bijl and J. Wilschut, Efficient encapsulation of plasmid DNA in anionic liposomes by a freeze/thaw-extrusion procedure, *J. Liposome Res.*, **8**, 485-497 (1998).
- 38) B.C. Ponnappa, I. Dey, G.C. Tu, F. Zhou, E. Garver, Q.N. Cao and Y. Israel, In vivo delivery of antisense oligodeoxynucleotides into rat Kupffer cells, *J. Liposome Res.*, **8**, 521-535 (1998).
- 39) O. Meyer, D. Kirpotin, K. Hong, B. Sternberg, J.W. Park, M.C. Woodle and D. Papahadjopoulos, Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotides, *J. Biol. Chem.*, **273**, 15621-15627 (1998).
- 40) M. Mercadal, J.C. Domingo, J. Petriz, J. Garcia and M.A. de Mardariaga, A novel strategy affords high-yield coupling of antibody to extremities of liposomal surface-grafted PEG chains, *Biochim. Biophys. Acta*, **1418**, 232-238 (1999).
- 41) K.W.C. Mok, A.M.I. Lam and P.R. Cullis, Stabilized plasmid-lipid particles: factors influencing plasmid entrapment and transfection properties, *Biochim. Biophys. Acta*, **1419**, 137-150 (1999).
- 42) P.C. Ross and S.W. Hui, Polyethylene glycol enhances lipoplex-cell association and lipofection, *Biochim. Biophys. Acta*, **1421**, 273-283 (1999).
- 43) A. Noguchi, T. Furuno, C. Kawaura and M. Nakanishi, Membrane fusion plays an important role in gene transfection mediated by cationic liposomes, *FEBS Lett.*, **433**, 169-173 (1998).
- 44) A. Watabe, T. Yamaguchi, T. Kawanishi, E. Uchida, A. Eguchi, H. Mizuguchi, T. Mayumi, M. Nakanishi and T. Hayakawa, Target-cell specificity of fusogenic liposomes: Membrane fu-

- sion-mediated macromolecule delivery into human blood mononuclear cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1416**, 339-348 (1999).
- 45) N.J. Zuidam and Y. Barenholz, Characterization of DNA-lipid complexes commonly used for gene delivery, *Int. J. Pharm.*, **183**, 43-46 (1999).
  - 46) F. Liu, J.P. Yang, L. Huang, and D. Liu, New cationic lipid formulations for gene transfer, *Pharm. Res.*, **13**, 1856-1860 (1996).
  - 47) T. Hara, F. Liu, D. Liu and L. Huang, Emulsion formulations as a vector for gene delivery in vitro and in vivo, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **24**, 265-271 (1997).
  - 48) F. Liu, J.P. Yang, L. Huang and D. Liu, Effect of non-ionic surfactants on the formation of DNA/emulsion complexes and emulsion-mediated gene transfer, *Pharm. Res.*, **13**, 1642-1646 (1996).
  - 49) A. Boletta, A. Benigni, J. Lutz, G. Remuzzi, M.R. Soria and L. Monaco, Non-viral gene delivery to the rat kidney with polyethylenimine, *Hum. Gene Ther.*, **8**, 1243-1251 (1997).
  - 50) E. Esposito, S. Sebben, R. Cortesi, E. Menegatti and C. Nasruzzi, Preparation and characterization of cationic microspheres for gene delivery, *Int. J. Pharm.*, **189**, 29-41 (1999).
  - 51) C.W. Pouton, P.Lucas, B.J. Thomas, A.N. Uduehi, D.A. Milroy and S.H. Moss, Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids, *J. Control. Rel.*, **53**, 289-299 (1998).
  - 52) P. Bandyopadhyay, B.T. Kren, X. Ma and C.J. Steer, Enhanced gene transfer into HuH-7 cells and primary rat hepatocytes using targeted liposomes and polyethylenimine, *Gene Transfer Techniques*, **25**, 282-292 (1998).
  - 53) H. Pollard, J.S. Remy, G. Loussouarn, S. Demolombe, J.P. Behr and D. Escande, Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells, *J. Biol. Chem.*, **273**, 7507-7511 (1998).
  - 54) N. Laurent, S.W.D. Coninck, E. Mihaylova, E. Leontieva, M.T. Warnier-Pirotte, R. Wattiaux and M. Jadot, Uptake by rat liver and intracellular fate of plasmid DNA complexed with poly-L-lysine or poly-D-lysine, *FEBS lett.*, **443**, 61-65 (1999).
  - 55) S. Tsunoda, T. Ishikawa, Y. Yamamoto, H. Kamada, K. Koizumi, J. Matsui, Y. Tsutsumi, T. Hirano, and T. Mayumi, Enhanced antitumor potency of polyethylene glycolylated tumor necrosis factor- $\alpha$ : A novel polymer-conjugation technique with a reversible amino-protective reagent, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**, 368-372 (1999).
  - 56) J.Y. Cherng, P.V.D. Wetering, H. Talsma, D.J.A. Crommelin and W.E. Hennink, Stabilization of polymer-based gene delivery systems, *Int. J. Pharm.*, **183**, 25-28 (1999).
  - 57) E. Forssen and M. Willis, Ligand-targeted liposomes, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **29**, 249-271 (1998).
  - 58) S. Li, H.M. Deshmukh and L. Huang, Folate-Mediated Targeting of Antisense Oligonucleotides to Ovarian Cancer cells, *Pharm. Res.*, **15**, 1540-1545 (1998).
  - 59) R.J. Lee and L. Huang, Folate-targeted, Anionic liposome-entrapped polylysine condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer, *J. Biol. Chem.*, **271**, 8481-8487 (1996).
  - 60) S. Kawakami, F. Yamashita, M. Nishikawa, Y. Takakura and M. Hashida, Asialoglycoprotein receptor-mediated gene transfer using novel galactosylated cationic liposomes, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **252**, 78-83 (1998).
  - 61) P.W. Cheng, Receptor Ligand-Facilitated Gene Transfer: Enhancement of Liposome-Mediated Gene Transfer and Expression by Transferrin, *Hum. Gene Ther.*, **7**, 275-282 (1996).
  - 62) M. Hashida, S. Takemura, M. Nishikawa and Y. Takakura, Targeted delivery of plasmid DNA complexed with galactosylated poly(L-lysine), *J. Control. Rel.*, **53**, 301-310 (1998).
  - 63) M. Pelegrin, M. Marin, D. Noel and M. Piechaczyk, Genetically engineered antibodies in gene transfer and gene therapy, *Hum. Gene Ther.*, **9**, 2165-2175 (1998).
  - 64) L. Mohr, J.I. Schauer, R.H. Boutin, D. Moradpour and J.R. Wands, Targeted Gene Transfer to Hepatocellular Carcinoma cells in vitro using a novel monoclonal antibody-based gene delivery system, *Hepatology*, **29**, 82-89 (1999).
  - 65) G. Bendas, A. Krause, U. Bakowsky, J. Vogel and U. Rothe, Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique, *Int. J. Pharm.*, **181**, 79-93 (1999).
  - 66) J.M. Kaplan, S.E. Pennington, J.A.S. George, L.A. Woodworth, A. Fasbender, J. Marshall, S.H. Chieng, S.C. Wadsworth, R.J. Gregory and A.E. Smith, Potentiation of gene transfer to the mouse lung by complexes of adenovirus vector and polycations improves therapeutic potential, *Hum. Gene Ther.*, **9**, 1469-1479 (1998).
  - 67) C. Qiu, M.B.D. Young, A. Finn and D.A. Dichek, Cationic liposomes enhance adenovirus entry via a pathway independent of the fiber receptor and  $\alpha$ V-integrins, *Hum. Gene Ther.*, **9**, 507-520 (1998).
  - 68) A. Mackensen, A. Lindemann and R. Mertelsmann, Immunostimulatory Cytokines in Somatic cells and Gene Therapy of Cancer, *Cytokine and Growth Factor Reviews*, **8**, 119-128 (1997).
  - 69) M.L. Slooten, R. Kircheis, F.J. Koppenhagen, E. Wagner and G. Storm, Liposomes as cytokine supplement in tumor cell-based vaccines, *Int. J. Pharm.*, **183**, 33-36 (1999).
  - 70) M.P. Lambros, F. Schafer, R. Blackstock and J.W. Murphy, Liposomes, a potential immunoadjuvant and carrier for a crytococcal vaccine, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 1144-1148 (1998).
  - 71) T. Nomura, K. Yasuda, T. Yamada, S. Okamoto, R.I. Mahato, Y. Watanabe, Y. Takakura and M. Hashida, Gene expression and antitumor effects following direct interferon(IFN)- $\gamma$  gene transfer with naked plasmid DNA and DC-Chol liposome complex in mice, *Gene Ther.*, **6**, 121-129 (1999).
  - 72) M. Savva, E. Duda and L. Huang, A genetically modified recombinant tumor necrosis factor- $\alpha$  conjugated to the distal terminals of liposomal surface grafted polyethyleneglycol chains, *Int. J. Pharm.*, **184**, 45-51 (1999).
  - 73) V.L. Truong-Le, J.T. August and K.W. Leong, Controlled gene delivery by DNA-gelatin nanospheres, *Hum. Gene Ther.*, **9**, 1709-1717 (1998).