

유전자치료를 위한 벡터 개발의 연구 동향

손은화 · 손은수* · 표석능**†

삼척국립대학교 생약자원개발학과, *한국과학기술정보연구원(KISTI) 정보분석부, **성균관대학교 약학부
(2004년 8월 4일 접수 · 2004년 10월 7일 승인)

Gene Therapy Vectors: A Current Research Insight

Eun-Hwa Son, Eun-Soo Sohn* and Suhkneung Pyo**†

Dept. of Pharmacognosy Material Development, Samcheok National University, Kangwon-do 245-711, Korea

*Department of Information Analysis, Korea Institute of Science and Technology Information(KISTI), Seoul 130-742, Korea

**Division of Immunopharmacology, College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon, Kyunggi-do 440-746, Korea

(Received August 4, 2004 · Accepted October 7, 2004)

ABSTRACT—The basic concept underlying gene therapy is that human diseases may be treated by the transfer of genetics material into specific cells of a patient in order to correct or supplement defective genes responsible for disease development. There are several systems that can be used to transfer foreign genetic material into the human body. Both viral and non-viral vectors are developed and evaluated for delivering therapeutic genes. Viral vectors are biological systems derived from naturally evolved viruses capable of transferring their genetics materials into host cells. However, the limitations associated with viral vectors, in terms of their safety, particularly immunogenicity, and their limited capacity of transgenic materials, have encouraged researchers to increasingly focus on non-viral vectors as an alternative to viral vectors. Although non-viral vectors are less efficient than viral ones, they have the advantages of safety, simplicity of preparation and high gene encapsulation capability. This article reviews the most recent studies highlighting the advantages and the limitation of gene delivery systems focused on non-viral systems compared to viral systems.

Key words—Gene therapy, Gene delivery systems, Viral vector, Non-viral vector

유전자치료와 벡터 개발

유전자치료(gene therapy)란 유전자 재조합 기술을 이용하여 치료유전자를 환자의 세포 안에 이입시켜 대상세포의 유전적 변형을 통하여 암, 감염성 질환, 자가면역질환과 같은 유전적 질환을 치료하거나 예방하는 방법을 말한다. 기존의 약물들이 대부분 질환의 증상에 대한 치료에 초점을 맞추었다면 유전자치료는 질병의 원인을 유전자 차원에서 해석하여 근본적으로 원인을 제거함으로써 치료하는 방법이며 이는 유전적 질환 및 난치병 극복을 해결할 것으로 기대되는 혁신적인 신개념의 치료법으로 인식되고 있다. 유전자치료는 한번의 투여로서 치료용 물질이 체내에서 장기간 지속적으로 발현될 수 있다는 점, 유전자 전달 및 발현을 인위적으로 조절함으로써 치료제 작용의 선택성을 추구할 수 있다는 점과 경우에 따라서는 환자의 변이된 유전 정보를 유전자 재조합에 의해 교정할 수 있다는 점 등이 종래의 치료법과는

근본적으로 다른 작용기전을 가진다.

유전자치료제 개발의 필수적인 요건은 치료 유전자의 개발과 벡터(vector)의 선정 및 조작에 있다. 치료 유전자는 실제 치료 효과를 나타내는 물질로 대상 질환에 따라 종류가 매우 다양하지만, 현재까지 유전자 기능이 규명되어 치료에 시도되는 유전자는 소수이며 인간게놈프로젝트의 완성으로 유전자 기능 연구가 이루어질 경우 유전자치료의 적용 범위는 크게 확대될 것으로 예측하고 있다.

유전자를 생체 내로 전달하는 물질을 운반체 또는 벡터라고 하는데, 벡터는 바이러스 이용 및 활용 여부에 따라 크게 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터로 구분된다. 벡터 시스템의 개발은 유전자치료의 성공을 좌우하는 가장 중요한 요소로서 이에 관련된 연구가 세계적으로 활발히 진행되고 있다. 현재 임상에서는 바이러스성 벡터가 주로 사용되고 있는데, 레트로바이러스(Retrovirus) 벡터가 28%, 아데노바이러스(Adenovirus) 26%로 가장 많이 이용되고 있고, 비바이러스성 벡터로 naked DNA 14%, 리포솜(liposome) 9%의 순이다(Figure 1).

그러나 바이러스성 벡터는 벡터의 기원이 병원성 바이러스

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 031)290-7713, E-mail : snpyo@skku.ac.kr

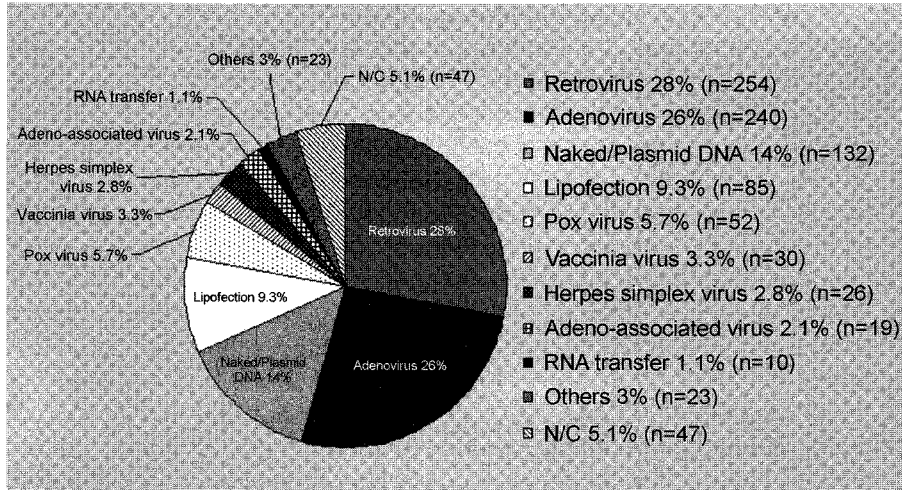


Figure 1—Gene therapy vectors used in clinical trials. N/C=not communicated.

스이기 때문에 안전성(safety)에 대한 문제점을 항상 내포하고 있다. 벡터 개발에 있어서 안전성은 매우 중요한데 치료 목적으로 사용된 잘못된 벡터 사용이 치명적인 임상결과를 가져올 수 있기 때문이다. 일례로 미국에서 아데노바이러스 벡터를 사용한 유전자치료 임상 시험 중 18세 소년이 사망한 사건이 있었으며(1999),¹⁾ 레트로바이러스를 이용한 유전자치료 중 백혈병(leukemia)이 유발되는 등(2000)²⁾ 바이러스 벡터를 이용하는데 위험성이 드러났다. 과거에 유전자치료 시도의 임상 실패 결과는 모두 바이러스성 벡터를 사용한 결과였으며, 이에 미국 식품의약국(FDA)이나 국립보건원(NIH)은 제품의 신뢰성 및 안전성(safety)을 높이는 규제를 강화하였고, 강화된 규제는 제품개발을 위한 시간을 지체시키는 요인으로 작용하여 임상에 막대한 금액이 소요되게 되었다.

최근 연구자들은 유전자 발현 효율이 바이러스성 벡터에 비하여 상대적으로 미진하지만 안전성이 뛰어난 비바이러스성 벡터가 인체에 적용하기 적합한 벡터로서 인식하고 있으며 이에 대한 연구가 활발히 진행 중이다.³⁾

1. 바이러스성 벡터(viral vector)

유전자 치료에서 벡터시스템으로 가장 널리 이용되고 있는 것은 바이러스성 벡터로 유전자 전달 효율이 높고 발현을 및 지속성이 우수하기 때문이다. 치료 유전자를 약화시킨 바이러스에 주입한 다음 바이러스가 인체내 표적 세포를 공격해 세포로 하여금 유전자에 감염되도록 하는 것이다. 이는 바이러스가 세포 속에 침입하면 자신의 유전물질을 즉시 세포에 옮기는 특성을 이용한 것으로 이 방법은 유전자치료 전체의 약 70%를 차지하고 있다(Figure 1).⁴⁾

(1) 레트로바이러스(Retrovirus)

레트로바이러스는 RNA 바이러스로 치료유전자를 안정(stability)하게 삽입하기에 가장 유용한 벡터로 여겨지고 있다. 크기는 약 8 kb로 다른 바이러스성 벡터에 비하여 비교적 큰 유전자를 삽입할 수 있으며, 역가도 10^6-10^7 pfu (plaque forming units)/ml 정도에 이르기 때문에 대상세포에의 감염에도 큰 문제가 없다. 그러나 레트로바이러스는 분열하는 세포에만 삽입되고 분열이 이루어지지 않는 세포에는 치료 유전자 이입이 불가능하기 때문에,⁵⁾ 주로 생체 외에서 배양한 대상세포에 유전자를 이입시킨 후, 이 세포를 생체 내에 이식하는 *ex vivo* 방법의 유전자 치료에서 이용되고 있다. 따라서 레트로바이러스 벡터는 분열이 계속 일어나는 암세포 치료에 주로 사용된다.

레트로바이러스는 packaging cell line(포장세포주)이 개발되어 있어 제조방법이 용이하다. 레트로바이러스 plasmid 내로 치료유전자를 삽입하고 이를 포장세포내로 감염시키면 재조합 바이러스가 생성되고, 이를 대상세포에 감염시키는 방식으로 scale-up도 가능하다. 또한 단백질 생산율이 비교적 높고, 일당 세포 내로 이입된 유전자는 세포의 염색체 내에 provirus의 형태로 계속 존재하기 때문에, 이입된 유전자의 생성물질이 오랜 기간 안정적으로 생산되어 발현이 장기간 지속된다는 장점이 있다. 이러한 특징 때문에 장기간 안정적인 유전자산물의 생성이 필요한 선천성 유전질환에 이 바이러스 벡터가 이용된다. 그러나 한편으로는 대상세포 염색체 내로 이입되는 레트로바이러스의 특징으로 삽입돌연변이(insertional mutagenesis)를 유발할 수 있다는 가능성이 제기되고 있다.

레트로바이러스는 분열 중인 세포에만 사용할 수 있다는

Table I—Companies with Programs using Viral Delivery System

회사	바이러스성 벡터 기술
Amsterdam Molecular Therapeutics	AAV
Applied Immune Science	AAV
ARK Therapeutics	Adenovirus, HSV, baculovirus
Austrian Nordic Biotherapeutic AG	Retrovirus
Aventis Gencell	Adeno-mediated gene expression
Avigen	AAV
Biovex (UK)	HSV-1
Calydon	Adenovirus
Canji (Schering Plough)	Adenovirus
Cantab Pharmaceuticals	DISC-HSV, TA-HPV
Cell Genesys	AAV, Lentivirus, Retrovirus, Adenovirus
Ceregene	Retrovirus
Chiron	AAV, Retrovirus
Clontech	Retrovirus
Cobra Therapeutics	Adenovirus
Collateral Therapeutics	Adenovirus, AAV, Retrovirus
Crucell	Adenovirus, AAV
DeveloGen	Baculovirus, Sheep Adenovirus
DNAVEC Research Inc.	Sendai
GenEra S.p.A.	Retrovirus
Genetic Therapy (Novartis)	Adenovirus, Retrovirus, HSV-tk
Genetix Pharmaceuticals	Lentivirus, Retrovirus
Genopoetic-AVAX Europe	Retrovirus, Adenovirus
Genotherapeutics, Inc.	Vesicular stomatitis virus (VSV)
GenStar Therapeutics	Adenovirus
GenVec	Adenovirus
Genzyme	AAV, Adenovirus
Henogen	Parvovirus
Introgen	Adenovirus
InvivoGen	Adenovirus
Lexicon Genetics Inc.	Retrovirus
MediGene AG	AAV, HSV
MondoGen GmbH	Hepatitis B virus (HBV)
Onyx	Adenovirus
Oxford BioMedica	Retrovirus
Qbiogene	Adenovirus
Somatrix Therapy	Retrovirus
Targeted Genetics	AAV
Therion Biologics	Poxvirus
TRANSGENE	Adenovirus, Retroviral, Vaccinia

자료 : US Gene Therapy Market, Frost & Sullivan (2002); Gene therapy, KISTI (2003)

제한점 외에도 복제가능성이 잔존하는 RCR(replication-competent retrovirus)이 나타나는 문제점과 혈청 보체(serum complement)가 레트로바이러스를 불활성화 시킬 수 있다는

단점이 있다. 최근 연구에서는 혈청 보체에 의한 불활성화를 억제할 수 있거나 RCR이 나타나지 않는 새로운 packaging cell line의 개발이 이루어지고 있다.⁶⁾

(2) 아데노바이러스(Adenovirus)

이중가닥 DNA 형태인 아데노바이러스는 분열세포와 비분열세포 모두에서 높은 발현율을 나타낸다. 바이러스의 게놈 크기가 36 kb에 달하기 때문에 크기가 큰 치료유전자도 삽입할 수 있으며, 생체 내에서 직접 대상세포를 감염시킬 수 있어 *in vivo* 유전자 치료가 가능하다. 10¹¹~10¹² pfu/ml의 높은 역가 바이러스 입자를 얻을 수 있어 scale-up이 가능하며 레트로바이러스보다 제조하기가 간편하다.

아데노바이러스는 레트로바이러스와는 달리 세포내에 침입하면 endosome을 형성한다. 형성된 endosome이 파괴되면서 나온 바이러스 게놈은 핵 내로 이동하여 바이러스 자신의 증식에 필요한 단백질을 합성하지만 대상세포의 염색체에 이입되지는 않는다. 대상세포에 유전자가 이입된 형태가 아니므로 바이러스의 유전자 발현은 일시적이다. 따라서 아데노바이러스성 벡터는 만성질환의 장기적 치료에는 적합하지 않으며 일부 급성질환에서 세포를 직접 죽이는 데는 유용하게 사용할 수 있다. 일시적이며 높은 발현율이 필요한 종양치료나 cystic fibrosis와 같은 치명적이지 않은 질병의 치료에도 사용할 수 있다. 최근에는 뇌암이나 간암의 치료에서 HSV-TK 유전자전달에 이용되었으며,⁷⁾ 폐암, head and neck cancer, 간암에 p53 유전자를 직접 전달하는데 이용되었다.⁸⁻⁹⁾

아데노바이러스는 분열·비분열세포 모두에 유전자를 전달하여 바이러스 입자가 거의 모든 세포에 감염될 수 있기 때문에 주변 정상세포에 독성을 가질 수 있으며 소량의 바이러스 입자에 대하여 면역반응이 과다하게 일어나는 단점이 있다. 쉽게 면역반응을 유도하기 때문에 대부분의 사람들이 자연에 존재하는 아데노바이러스에 노출된 결과로 아데노바이러스에 대한 항체를 가지고 있어 벡터가 효과를 나타내지 못하는 경우도 있으며, 벡터를 재주입할 경우 이미 바이러스에 대해 확립된 면역반응에 의하여 매개체가 파괴됨으로써 반복적인 유전자 치료를 불가능하게 만든다. 이에 아데노바이러스는 47개 다른 serotype이 있으므로 항체 반응에 의해 중화되지 못하게 하기 위해서 독특한 serotype이 순차적으로 주입된다. 따라서 연구자들은 아데노바이러스의 어떤 단백질에 의하여 면역반응을 초래하여 항체가 형성되는지를 규명하고 있으며, 그 단백질을 제거시킨 아데노바이러스 벡터를 제작하여 유전자 발현이 감소되었을 때 반복적으로 이용할 수 있도록 하고 있다.

(3) 아데노바이러스 관련 바이러스(AAV; adeno-associated virus)

Parvovirus에 속한 아주 작은 바이러스로 $10^6 \sim 10^7$ cfu/ml 정도의 역가를 가지며 세포분열 여부에 상관없이 다양한 세포(근육, 뇌, 폐, 망막, 간, 귀, 심장, 혈관 등)에 효율적으로 감염시킨다. 병원성이 없으며 바이러스 게놈 대부분이 치료 유전자에 의해서 대치될 수 있으므로 면역반응을 유도하지 않아 반복 투여도 가능하다. 또한 AAV는 대상세포의 염색체내로 삽입됨으로써 치료단백질이 장기간 안정적으로 발현된다. 레트로바이러스와는 달리 대상세포의 특정 염색체(19번)에 대부분이 융합됨으로 삽입돌연변이의 위험성이 적어 AAV는 레트로바이러스와 아데노바이러스의 장점을 모두 갖고 있는 이상적인 벡터시스템으로 인정받아 왔다.

그러나 AAV는 크기가 작아 삽입될 수 있는 유전자의 크기가 4.5 kb 미만으로 제한이 따르고, 아직까지 높은 역가를 생산하는 packaging cell line이 확립되지 않아 제조방법이 번거롭고 까다롭다. 또한 helper virus로 이용되고 있는 아데노바이러스의 오염을 제거해야 하는 어려움이 있다. AAV는 현재 cystic fibrosis 유전자치료를 응용되고 있으며,¹⁰⁾ 또한 인체 제 9혈액응고인자 유전자를 가진 AAV vector를 쥐의 간세포에 감염시켰을 때 6개월 이상 안정적으로 제 9혈액응고인자가 생성된다는 보고는 이 벡터시스템의 유용성을 증명해 주고 있다.¹¹⁾

(4) 렌티바이러스(lentivirus)

최근 각광 받고 있는 벡터는 앞에서 설명한 AAV로서 안전하고 효과적이지만 바이러스 크기가 작아 운반할 수 있는 유전자의 크기가 제한되어 있다. 그러나 레트로바이러스의 일종인 렌티바이러스는 인체 면역반응을 회피할 수 있을 뿐만 아니라 망막, 신경, 근육 그리고 간세포와 같은 분열하지 않는 세포에도 8 kb정도 크기의 유전자 전달이 가능하다. 렌티바이러스는 1990년대 후반부터 개발되기 시작한 비교적 새로운 레트로바이러스 벡터로 HIV(human immunodeficiency virus) 골격을 변형한 것이다.¹²⁾

HIV 벡터를 이용한 유전자 치료는 현재 유전자를 쥐의 뇌, 간, 근육, 골수, 각막세포에 결합시키는데 사용하고 있는데 삽입된 유전자들은 몇 개월 동안 기능을 지속하는 것으로 나타났으며 아직까지 병리학적인 변화는 보고되지 않았다.¹³⁾ 그러나, HIV를 이용한 유전자치료는 독력형태(virulent form)로 재조합하여 AIDS를 일으킬 수 있다는 안전성 문제로 아직 개발단계에 있으며, 그 밖에도 packaging cell line의 개발, HIV의 보관 및 품질관리 등 여러 가지 해결해야 할 문제점들이 남아있다. 최근 연구는 HIV 단백질 막(膜)을 인간

세포를 감염시킬 수 있는 소 면역 결핍바이러스(BIV; Bovine immunodeficiency virus) 막으로 대체시키거나, 바이러스 복제를 완전히 억제할 수 있는 효과적인 약 개발 등으로 HIV 바이러스 사용에 대한 위험성을 보완해 줄 수 있는 방향으로 연구가 진행 중이다.¹⁴⁾

(5) 헤르페스 바이러스(HSV; Herpes simplex virus)

중추신경계에 특이적으로 감염하는 DNA 바이러스로 152 kb의 큰 게놈사이즈를 가지고 있다. HSV는 80개 이상의 유전자를 포함하고 있어 벡터를 제조하기가 힘들지만, 반면에 여러 가지 유전자를 동시에 운반할 수 있다는 장점을 가진다. 현재 사용되고 있는 HSV 시스템은 복제결합재조합(replication-defective recombinant) HSV와 바이러스 유전자 중에 최소한의 복제, 패키징(packaging) 부분만을 가지고 있는 amplicon system vector가 있다. HSV 벡터는 감염효율이 낮고, 경우에 따라 세포독성을 보이며, 유전자 발현 기간이 짧지만 큰 치료유전자를 전달할 수 있다는 점과 신경세포를 감염을 할 수 있어 알츠하이머병, 파킨슨병 등의 신경계 질환이나 중추신경계 종양에 사용될 수 있다는 특징을 가지고 있다.

(6) 바이러스성 벡터의 기술개발 동향

유전자치료의 개념이 처음 도입되면서 바이러스성 벡터가 가장 많이 이용되었으나 분열 중인 세포만을 감염시키거나 복제 가능성이 잔존하거나, 심한 면역반응을 일으키는 등 안전성에 대한 문제점이 발견되었고, 그 밖에도 유전자 발현이 일시적이거나, 유전자를 삽입하는데 제약이 따르는 등이 한계점이 드러났다. 이에 여러 개 벡터시스템의 장점을 혼합한 키메라(chimeric) 바이러스 벡터의 등장이나 벡터를 변형시키거나 숙주의 면역반응을 조절하는 방법 등 새로운 바이러스성 벡터 개발이 이루어졌다.¹⁵⁾

키메라(chimeric) 바이러스 벡터-아데노바이러스와 레트로바이러스의 장점을 혼합한 키메라 바이러스 벡터에 대한 연구가 진행 중인데 이 시스템에서 아데노바이러스는 대상세포가 일시적으로 *in vivo* 상태에서 레트로바이러스를 증식시키는 기능을 가지고 있다. 여기서 만들어진 대량의 레트로바이러스는 주변의 세포로 안정적으로 전파된다.¹⁶⁾ 이와 같이 키메라 바이러스 벡터는 현재 사용 가능한 여러 가지 벡터를 조합하여 새로운 특징을 가진 벡터를 생산하는 방법이다.

벡터의 변형-벡터를 변형시키는 방법으로 항원으로 작용하는 바이러스의 단백질을 변형시키는 방법과 면역반응을 조절하는 물질이 벡터에 의하여 만들어지도록 하는 방법이 있다. 전자의 경우 바이러스의 정제가 어려울 뿐만 아니라 벡

터로서의 특성을 잃어버릴 가능성이 많아 후자의 경우를 많이 사용하고 있는데, 여기에 사용되는 물질로는 adenoviral glycoprotein 19K, herpes simplex virus immediate early protein ICP47, IL-10, MHC class I 및 II 단백질 등이 있다.

특히, 생체 내에서 강한 면역반응을 유발하는 것이 단점인 아데노바이러스 벡터에 있어서 벡터의 변형이 연구되고 있는데, 아데노바이러스 벡터에 종양 특이적 또는 조직 특이적 프로모터를 넣어 특이성을 높이는 방법으로, 일단 프로모터의 조작으로 암세포에만 특이적으로 전달되면 아데노바이러스는 복제 능력이 발휘되어 종양세포 용해성 바이러스 벡터(oncolytic viral vector)가 되는 것이다. 현재 조직 특이적으로 개발된 프로모터로는 전립선암에서 PSA(prostate-specific antigen) 유전자, 위암이나 결장암에서 CEA(carcinoembryonic antigen) 유전자, 간암에서 α -fetoprotein 유전자를 이용하게 되는데, 이 프로모터를 사용하여 유전자 치료를 할 경우 치료유전자는 프로모터가 활성을 나타내는 조직이나 세포에서만 특이적으로 발현하게 되어 선택적으로 암세포를 치료할 수 있게 된다. 또, 최근 AAV에서 변형 가능한 capsid region들이 알려지면서 AAV를 특정한 세포로 표적화 시키는 가능성들이 연구되고 있다.

숙주의 면역반응을 조절하는 방법-숙주의 면역반응을 조절하기 위해서는 장기이식에서 사용되는 면역 억제방법을 이용하는데, 실제로 사이클로스포린(cyclosporin), FK506, 항 CD4 항체뿐만 아니라 항-CD40 리간드, CTL4Ig, 항LFA-1과 같은 다양한 방법이 연구되었으나 이러한 면역 억제에 의한 숙주의 면역반응 조절은 장기적으로는 감염이나 또 다른 종양의 발생과 같은 문제를 야기할 수 있어 암환자의 유전자치료에서 단기적으로 이용하거나 보다 특이적인 면역 억제법의 개발이 요구되고 있다.

표적지향적 유전자치료를 위한 벡터개발-In vivo 유전자치료에서는 치료유전자를 체액 중으로 또는 조직 내로 직접 투여하게 되는데, 유전자가 특히 혈액과 같은 전신 순환계를 통하여 주입될 경우에는 신체의 거의 모든 세포가 유전자 이입의 대상이 될 수 있기 때문에 전신적 부작용, 불필요한 유전 형질 변화, 치료효과의 감소 등 여러 가지 문제들이 생길 뿐만 아니라, 특정 대상세포에 유전자 치료 용량이 전달되도록 하기 위하여 다량의 유전자를 투여해야 한다. 유전자 치료가 이러한 단점들을 지양하고 궁극적으로 실용성과 효율성, 안전성이 큰 대중적 의료수단의 형태를 갖기 위해서는 유전자의 전달과 발현을 특정 목적세포에 집중시킴으로써 부작용을 최소화하고 치료효과를 극대화하려는 유전자 치료전략으로 표적지향적 벡터 개발이 필요하게 되었다. 최근에는 HIV, HSV, rabies virus, baculovirus 등과 같은 바이러스

본래의 조직 친화성을 그대로 유전자전달에 활용하는 경우 이외에도 galactosylation이나 desialylation 등 벡터의 표면을 효소적 또는 화학적 방법으로 변화시켜 특정 세포에 높은 친화성을 갖도록 유도하는 경우, 수용체-리간드간 상호반응에 의하여 표적세포의 표면단백질과 특이적으로 결합할 수 있는 재조합 단백질을 벡터의 표면에 합입시켜 재조합 벡터를 제조함으로써 내재된 유전자를 특정세포에 선택적으로 전달하고자 하는 경우, 표적세포 표면항원에 대해 특이성을 갖는 항체분자를 벡터의 표면에 발현시키거나, 세포 표면물질과 벡터 표면물질에 대해 각각 특이성을 보이는 항체들을 streptavidin/biotin으로써 결합시킨 bispecific antibody를 이용하여 특정표면 항원이 존재하는 제한된 세포군에 목적 유전자를 전달시키는 경우 등이 알려져 있다.^{3,10)} 그 밖에도 약독화한 Salmonella 균을 벡터로 이용하여 IL-12, GM-CSF 또는 CD40L 유전자를 경구로 전달하여 Peyer's patch 등을 표적세포로 이용하는 점막면역을 증강시키는 방법으로 암을 치료하는 새로운 치료법이 제시된 바 있다.¹⁷⁾

G/E- 바이러스 입자가 아닌 DNA와 대장균의 단백질을 전달 매개체로 사용하여 항생제 저항성 유전자의 발현을 인체 계층의 유전자 염기서열을 가진 세균을 대상으로 하여 확인한 바 있는데, 이는 바이러스 벡터를 사용한 경우에 야기될 수 있는 면역반응의 유도를 피할 수 있고, 오직 하나의 유전자 복사체만이 생성된다는 장점을 가진다. 예를 들면 최근에 Salmonella 균을 이용한 벡터가 사용되었는데, Salmonella 균이 정상세포보다 암세포에 200-1000배 친화성을 가지고 있는 점을 이용하여 치료유전자인 cd(cytosine deaminase)를 넣어서 전달하는 방법이 보고되었다.¹⁸⁾

2. 비바이러스성 벡터(nonviral vector)

바이러스성 벡터는 발현율 및 지속성면에서 매우 우수하지만 면역반응에 의한 안전성이 문제점으로 지적되고 있으며, 작은 서열의 DNA만을 전달할 수 있어 large scale의 어려움이 있다. 또한 바이러스가 병원성 유래이기 때문에 항상 질병을 유발할 잠재력을 가지고 있으며, 삽입되었을 경우 돌연변이성(mutagenesis), 발암성(oncogenesis)에 대한 가능성이 배제되지 않는다. 이에 반하여 비바이러스성 벡터는 제조방법이 쉽고, 면역반응을 유발하지 않으며, 자체 면역원성(immunogenicity)이 낮아서 반복 투여가 가능하다. 또한, 삽입되어지는 유전자의 크기에 제한이 없고 특정세포에 표적화하기 위하여 리간드 또는 단클론 항체를 결합하기 쉽다. 이러한 이유로 최근에는 비바이러스성 벡터 개발에 대한 연구가 집중되고 있다.

Table II—Companies with Programs using Nonviral Delivery System

회사	비바이러스성 벡터 기술
Athersys	Systemetic microchromosomes
Aventis Gencell	naked DNA
Biovector Therapeutics (France)	Liposome
Chiron	Liposome, naked DNA
Chromos Molecular Systems (Canada)	ACse Artificial chromosomes
Copernicus Therapeutics, Inc.	PLASminDNA Complexes
Darwin Molecular	HSV-tk
Gentric	Liposome
Gentric Therapy System	Synthetic gene delivery systems
Genzyme	Liposome
InvivoGen	Lipofection
MediGene AG (German)	Bacterial artificial chromosomes
Neurotech SA (France)	Immortalised brain cells, retinal pigment cells
Qbiogene	Liposome
Replieor	Artificial chromosome
Schering Plough Canji	Mammalian artificial chromosomes
Targeted Genetics	Liposome
Tosk	Transposon based vectors
TRANSGENE	Synthetic lipids, cellular vectors
Transkaryotic Therapies	Liposome
Valentis	Liposome
Vical	Liposome, naked DNA

자료 :US Gene Therapy Market, Frost & Sullivan (2002); Gene therapy, KISTI (2003)

그러나 비바이러스성 벡터는 바이러스성 벡터에 비하여 유전자 전달효율이 낮고, 유전자 발현이 일시적이며, 생체 내에서 혈청단백질 또는 대식세포를 포함한 혈액세포로 인하여 대상세포로의 전달이 쉽지 않은 단점이 있어 원하는 세포로의 표적화, 생체내 장애물, 세포내 장애물(endosome, lysosome)들을 극복할 수 있는 안정성이 해결해야 할 과제로 지적되고 있다.

(1) Cationic lipids (Lipid-DNA complex : Lipoplex)

비바이러스성 벡터 중 가장 광범위하게 이용되고 있는 양이온성 지질(cationic lipid 또는 양이온성 리포솜(liposome))은, 수송하는 유전자의 크기에 제한을 받지 않고, 제조가 용이하고, 면역원성이 낮고, 세포 독성이 없어 안전성이 현저히 높다.¹⁹⁾ 그러나 유전자 전달 효율이 바이러스성 벡터에 비하여 낮고,¹⁵⁾ 혈청 성분에 의해서 리포솜 특성이 변화하고 혈장단백질에 의한 DNA/리포솜 복합체의 파괴 등이 단점으로 지적되고 있다.²⁰⁻²¹⁾

양이온성 지질과 중성지질로 형성된 리포솜은 음전하를

띤 DNA와 자발적으로(spontaneously) 결합하게 되어 핵산을 따라 aggregated vesicle을 형성하게 된다.²²⁾ 이러한 결합체의 구조는 리포솜이 DNA를 봉입(encapsulation)하는 것은 아니고 DNA의 표면을 따라 결합하고 있는 것이므로 DNA의 실제 크기와 모양은 유지되고 있다. 양이온성 리포솜은 대상세포막의 음전하와 반응하여 융합(fusion)되며 이때 DNA가 세포막을 직접 통과하게 된다.²³⁾ 이러한 성질 때문에 양이온성 지질의 구조 및 특성, 리포솜의 조성 및 형태, DNA/리포솜 전하 비율, DNA/리포솜 복합체 크기 등 다양한 인자들이 세포막으로의 유전자 전달 효율을 높이는데 연구되고 있다. 현재 가장 많이 이용되고 있는 양이온성 인지질은 N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammoniumethyl sulfate(DOTAP)와 N-(1-(2,3-dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride(DOTMA)²⁴⁾가 있다. 그 밖에도 dioleoylphosphatidyl-ethanolamine(DOPE)과 같은 중성지질을 사용하기도 하는데 모두 세포막과의 융합을 높여 DNA의 전달율을 높이기 위한 방법이다.²⁰⁾

Figure 2는 리포솜/DNA 복합체가 세포내 및 핵내로 전달되는 과정을 나타낸 것이다.²⁵⁾ 이 과정을 크게 리포솜/DNA가 endosome으로 선택적인 내재화(internalization) 하는 과정, endosome에서의 탈피(escape) 과정, DNA가 핵안으로의

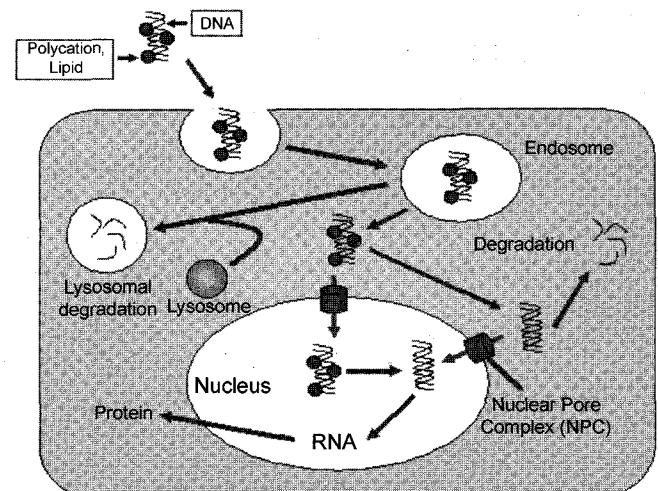


Figure 2—A schematic diagram illustrating the intracellular pharmacokinetic model of the genes. The intracellular disposition of the gene is represented. A complex of DNA and cationic lipids/polycations bind to the plasma membrane electrostatically and is internalized via endocytosis. Endosomal plasmid DNA fused with a lysosome is degraded. A certain fraction of the endosomal DNA is released into the cytosol where a part of the DNA dissociates from the cationic lipids/polycations. Free plasmid DNA is subject to degradation by nucleases or is partially translocated to the nucleus. Alternatively, DNA enters the nucleus in a complexed form with cationic lipids/polycations followed by dissociation in the nucleus. Finally, free DNA in the nucleus are transcribed.

위치(localization)하는 과정으로 나누어 볼 수 있다. 각 단계마다 유전자 전달효율을 높이려는 연구가 이루어지고 있어 자세히 언급하기로 한다.

리포좀/DNA 복합체는 세포내로 endocytosis된 다음 endosome compartment내로 체류하게 되는데 endosome은 수분내로 lysosome과 fusion하여 endolysosome을 형성하게 된다. 이때 lysosome의 각종 소화효소(digestive enzyme)들은 fusion된 vesicle내에 존재하는 유전자 등의 세포내 유입물질을 분해하게 된다. 이 과정이 비바이러스성 벡터보다 바이러스성 벡터가 유전자 발현 효율이 우수한 요인이다. 즉, 바이러스 벡터의 경우는 세포에 감염되어 세포질내로 유전자가 직접 들어감으로써 lysosome을 거치지 않게 됨으로써 유전자 분해를 피할 수 있기 때문에 높은 발현율을 가진다. 따라서 리포좀/DNA 복합체가 endolysosome을 형성하기 전에 endosome에서 얼마나 많은 비율의 유전자가 세포질로 탈피(escape)해 나오는지 유전자 전달 효율을 결정하는데 중요한 인자가 된다.²⁶⁾ 이러한 과정을 이용하여 endosome내에서 유전자가 세포질로 탈피하는 성질을 부여하려는 시도들이 진행되고 있다. 인지질로 구성된 비바이러스성 수송체에 endosome 막에 통로(pore)를 형성하는 listeriolysin이라는 listeria균의 성분물질을 분리 정제하여 함께 수송해줄 경우, 세포내로 수송된 유전물질이 endosome에서 세포질내로 전달 효율이 현저히 증강되었다는 연구결과가 있었다.²⁷⁾ 또한 endosome의 산도는 약 pH 5.0 정도되므로 이를 이용한 pH-sensitive lipids를 제조하여,²⁸⁻²⁹⁾ pH가 낮아지면 liposome 구조가 불안정해지면서 물질을 방출하는 방법도 보고되었다.³⁰⁾ 그 밖에도 DOPE(dioleoylphosphatidyl ethanolamine), polyethyleneimine(PEI),³¹⁻³²⁾ amphiphilic peptides³³⁻³⁶⁾ 등이 endosome 막을 불안정하게 하는 역할을 함으로써 이러한 문제를 해결하고자 개발되고 있으며, 아데노바이러스가 세포에 감염할 때 endosome 막을 파괴하여 탈피하는 과정을 이용하기 위하여 아데노바이러스를 DNA 복합체와 함께 이입하는 방법도 연구되고 있다.

일단 endosome에서 나온 plasmid DNA는 세포질내의 DNase에 의해 가수분해 되기 때문에 안정성에 유의해야 한다.³⁷⁻³⁸⁾ 대부분의 경우 plasmid DNA는 리포좀이나 폴리머로 condense 되는데 리포좀 복합체는 DNase에 저항성을 지닌다. Plasmid DNA와 리포좀의 결합력은 유전자를 핵안으로 전달시키고 유전자를 발현 하는데 매우 중요한데, 만일 분해가 너무 쉽게 되면 세포질에서 대부분의 plasmid DNA가 분해되고 분해가 너무 느리면 핵안으로 들어가서 핵안으로 전사인자가 접근하는 것을 방해받음으로써 유전자 발현이 낮아진다. 그러므로 복합체의 안정성은 유전자 발현율을

높이기 위하여 세포질에서나 핵안에서 최적화 되어야 한다 (Figure 2).

다음은 핵막으로의 장애이며, endosome에서 탈피한 리포좀/DNA 복합체는 핵안으로 들어가 발현이 되는데, 안정되어 있는 핵막을 통과하기는 매우 어렵다. 핵막은 이중 지질막으로 구성되어 있으며 세포질과 핵 사이에 NPC(nuclear pore complex)에 의해서 조절되는 수송인자(transporter)가 있다. NPC는 >45~45 kDa 이상의 분자에 대한 확산을 제한하여 조절한다. plasmid DNA는 보통 이 수치보다 높으므로 핵안으로의 translocation이 매우 제한되어 있다. 보통 핵막이 사라지게 되는 세포 유사분열시기에 free plasmid DNA가 핵안으로 통과할 수 있거나,³⁹⁾ NLS(nuclear localization signal)를 가지고 있는 핵친화성 단백질(>45 kDa)만이 NPC가 통과시킬 수 있다. NLS는 plasmid DNA를 핵막으로 접근시키고 핵안으로의 전달 및 유전자 발현을 증가시키므로,⁴⁰⁻⁴⁵⁾ NLS과 같은 펩타이드 등을 이용하여 핵안까지 전달하는 효율을 높이는 방법이 개발되고 있다.

Figure 3은 최근에 가장 연구가 활발한 비바이러스성 유전전달 시스템의 모델을 제시한 것이다.²⁵⁾ 다기능성 외피타입의 유전자 전달시스템을 디자인하여 세포특이성을 증가시킨 모델인데, targeting ligand는 혈액을 순환할 때 특정 세포 안에 선택적으로 내재화(internalization) 될 수 있도록 하는 것이다. Targeting ligand를 DNA-복합체에 결합하여 수용체-매개 endocytosis 방법에 의한 선택적 내재화를 늘리는 기술로 transferrin receptor나 인슐린 receptor의 단클론항체 등이 이용되고 있다.⁴⁶⁻⁴⁸⁾ 또한, plasmid DNA를 양이온성 지질의 이중막으로 encapsulated시키고 그 표면을 PEG

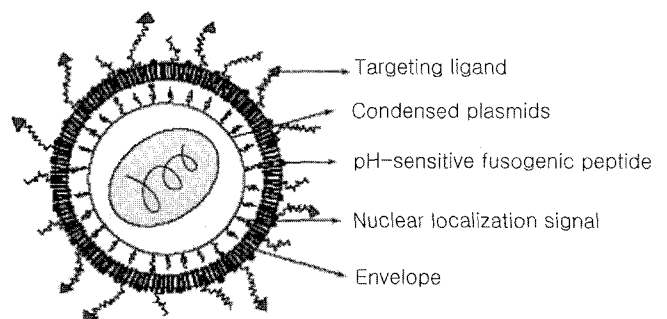


Figure 3—An optimized/ideal multifunctional non-viral gene delivery system. A multifunctional, enveloped type gene delivery system was designed that has specific ligands for selectively internalizing into cells during a long blood circulation time. After receptor-mediated endocytosis, this system can escape from endosomes by a pH-sensitive fusion mechanism similar to that of the influenza virus, and reach the nucleus using a sorting device such as a nuclear localization signal. This system also has a specific mechanism to enhance intranuclear transcriptional efficiency (dumbbell-shaped), thus maximizing the efficacy of gene expression.

(polyethyleneglycol)로 처리하여 대식세포류에 의해 복합체가 옹소닌(opsinins)으로 인식되는 것을 막음으로써 오랫동안 혈액 내에 존재할 수 있도록 개발한 SPLP(stabilized plasmid-lipid particle) 기술도 있다.^{22,49)} 그 밖에도 PEGylation immunoliposome 시스템의 개발도 이루어지고 있다.⁵⁰⁾ 수용체-매개 endocytosis가 일어난 후, 복합체는 Figure 3에서 설계된 pH-sensitive fusogenic peptide에 의해 endosome에서 탈피될 수 있으며, nuclear localization signal(NLS)에 의하여 핵안으로 localization되어 핵에 도달할 수 있게 된다.

리포솜의 종류에는 음전하의 DNA와 쉽게 복합체를 형성하는 양이온성 리포솜뿐만 아니라 음이온성 리포솜이 있다. 음이온성 리포솜은 혈청 하에서 양전하성 리포솜이 음전하를 띠는 단백질과 흡착해 양전하가 중화되고 복합체가 커짐으로 유전자 발현율이 감소하는 단점이 보완될 수 있어 양이온성 리포솜보다 안정하고 독성이 거의 없다. 그러나 DNA가 음이온을 띠고 있어 DNA를 리포솜에 봉입시키는 방법과 DNA의 생리적 활성이 그대로 유지되는 기술이 필요하며, 세포막이 음전하를 띠고 있기 때문에 DNA를 대상세포에 전달하는 것이 해결해야 할 과제로 남아있다.

(2) Cationic polymer (Polymer-DNA complex: Polyplex)

양이온성 지질과 마찬가지로 양이온성 폴리머는 음전하를 띤 DNA와 정전기적 인력에 의하여 결합된다. 그러나 양이온성 폴리머는 양이온성 지질에 비하여 DNA를 효과적으로 축합하여 안정시키고,⁵¹⁾ 제조방법도 간편하다. 양이온성 고분자가 commercial available한 경우 이를 구입하여 일정농도의 용액으로 녹이거나 희석한 다음 이를 수송하려는 유전자와 vortex하여 수분간만 방치하면 모든 제조 단계가 끝난다.

양이온성 폴리머에는 직선 형태의 구조를 가진 폴리머 PLL(poly-L-lysine),⁵²⁾ PVP(poly(N-ethyl-4-vinylpyridinium bromide)와, 직선형 PEI(linearpolyethyleneimine),⁵³⁾ 키토산,⁵⁴⁾ PDMAEMA(poly(dimethylaminoethyl methylacrylate) 등이 있고, 가지 형태의 구조를 가진 PEI(polyethyleneimine), PAMAM(polyamidoamine), fractured PAMAM 등이 있다. 이외에도 폴리머의 독성, 폴리머-유전자 결합체의 크기 등을 조절하기 위하여 PEG(polyethyleneglycol) 등을 붙인 블록형 혼성 중합체도 있다. 위의 폴리머들 중 PEI와 fractured PAMAM의 경우가 가장 유전자 전달 효율이 높은데, 유전자를 PEI와 복합체 형태로 체내 투여한 경우 유전자의 체류 시간 및 발현 지속 시간이 naked DNA에 비하여 현저히 증가되는 것을 관찰되었다.⁵⁵⁾ 그러나 PEI의 경우 분해되기 어려운 탄소-질소 결합으로 이루어져 있으므로 세포 독성이 매

우 크다. 또한 신체 내에서는 분해되지 않은 PEI가 신장에서 배출되지 못하고 체내에 머물러 있으므로 위험성이 높다. 따라서 생분해성(biodegradability) 결합으로 이루어져 있는 양이온성 폴리머가 개발되고 있는 상황이다. 최근에는 ExGen500 (Fermentas社)와 같은 직선형 PEI 계열과 같은 새로운 고분자성 물질이 개발되어 DNA/ExGen 복합체가 세포에 빠르게 endocytosis되어 primary cell line의 유전자 전달 효율을 높인 바 있다.⁵⁶⁾

폴리머/DNA가 어떻게 세포막을 통과하는지의 기전은 잘 알려져 있지 않다. 대상 세포에 도달하기 위해서 이 복합체는 혈액 내를 순환하고 있는 면역세포의 surveillance 작용을 피할 것으로 생각되고, 복합체가 세포막내로 들어가서 핵까지 전달되는 과정은 리포솜/DNA 복합체의 전달과정과 매우 유사할 것으로 생각된다.⁵⁷⁻⁵⁸⁾ 지금까지 개발된 양이온성 폴리머는 DNA의 세포막 통과효율이 낮다. 입자크기는 수용체 매개 세포내의 endocytosis를 통한 선택적인 internalization 타겟팅에 매우 중요한 요소가 된다. 폴리머-유전자 결합체의 크기는 폴리머/DNA 전하량 비에 따라 크게 차이가 나는데, 폴리머/DNA 비가 1에 가까워질수록 폴리머-유전자 결합체의 크기가 커지고(소수성이 커지면서 서로 결합함(aggregate), 1에서 가장 큰 결합체가 형성된 후, 1 보다 커지게 되면 다시 결합체의 크기는 작아지게 된다. 그 크기는 수십 nm에서 수 um에 이르기까지 다양하다.

폴리머 복합체는 양이온성 지질보다 DNA 축합에 용이하기 때문에 핵산분해효소의 작용을 방어하여 리포솜/DNA 복합체보다 치료유전자를 핵으로 전달하는데 효율적이다.^{52,59)} 또한 폴리머는 structural variability와 versatility가 있기 때문에 다양하게 타겟분자에 대한 공유결합을 가질 수 있다. 폴리머는 지질에 비하여 결합시킬 수 있는 작용기가 많으므로 리간드에 의한 세포 지향성을 띠게 할 수 있다. 즉, 특정 세포에만 분포하는 수용체에 결합하는 리간드를 폴리머에 붙이게 되면 그 세포에 대한 표적지향성을 높일 수 있게 된다. 또한 지질과 마찬가지로 NLS 등에 의한 핵 전달 효과를 높이는 것 역시 기대할 수 있다.

최근에 고분자성 물질만을 사용했을 때 유전자 전달 효율이 감소했다는 보고들이 있어 최근에는 먼저 양이온성 고분자 물질로 plasmid DNA를 축합 시킨 후 양이온성 리포솜과 복합체를 형성하여 사용하는 방법들이 연구되고 있으며, 그 밖에도 DNA-polylysine 복합체에 바이러스형체를 첨가하여 DNA 이입효율을 증가시킨 연구결과도 있다.⁶⁰⁾

(3) Cationic peptides

유전자 전달에 사용되는 양이온성 펩타이드는 amphiphilic

peptides이다.⁶¹⁾ 이는 산성 환경에서 구조적 변화가 일어나 endosomal/lysosomal pathway를 피하게 되어 유전자 파괴를 막을 수 있다. 또한, 이들은 양전하를 띤 아미노산(히스티딘, 리신, 아르기닌)을 포함하고 있어 DNA 축합에 효과적일 수 있다. α -helical KALA peptide(influenza virus가 세포막에 이입될 수 있는 influenza HA-1 subunit 부위에서 유래)는 배양세포에서 유전자 전달에 성공적으로 이용된 초기 양이온성 펩타이드 중의 하나였다.³⁶⁾ 이 펩타이드 벡터의 효능은 aggregation과 endosome 탈피과정에 주요 기능을 나타내는 소수성 부분에 의해 좌우되는데,⁶²⁻⁶³⁾ 펩타이드 결합에 시스템인을 첨가함으로써 세포질내로의 DNA 방출이 증가되고, DNA와 peptide 복합체 내에 환원성 이황화결합(disulfide bond)이 형성되었다.⁶⁴⁾

양이온성 펩타이드는 다른 벡터시스템과 같이 수용체-매개 유전자 전달이 리간드 결합을 통해서 이루어지는데,⁶⁵⁾ 현재 *in vitro*에서 peptide gene carrier가 주로 발견되었으나,^{36,66-68)} *in vivo*에서의 작용은 연구 중에 있다. 최근 연구는 정맥내로 펩타이드 벡터를 이용하여 마우스에 transfection 시켰을 때 주로 폐에서 유전자가 발현되었다. 그러나 유전자 전달 효율은 리포솜과 PEI벡터에 비하여 효과가 10~40배 적었다.⁶⁹⁾

(4) 기타

바이러스벡터와 비바이러스성 벡터를 동시에 사용하는 방법으로 바이러스성 벡터를 리포솜에 봉입한 virosome을 이용하여 면역반응을 회피함으로써 유전자 전달 효율을 높인 결과가 보고된 바 있다.⁷⁰⁾ 차세대 벡터시스템으로 유전자 전달 효율이 우수한 바이러스성 벡터의 장점과 안전성이나 면역반응 면에서 우수한 비바이러스성 벡터의 장점을 모두 가지는 혼성화벡터(hybrid vector) 개발이 기대된다.

3. 물리적 유전자 전달방법

유전자 직접 이입법의 최대 장점은 필요한 유전자만 대상 세포에 이입할 수 있다는 점이다. 이 방법의 단점은 이입 효율이 낮고, 이입된 유전자의 발현이 일시적이라는 것이다. 생체 외에서 세포내에 유전자를 이입하기 위하여 예전부터 사용하던 방법 중에 calcium phosphate법, DEAE-dextran법 등이 있으나 유전자 치료에는 적당치 않고, 요즘 개발된 전기충격법(electroporation)법, 초음파를 이용하는 방법, 유전자총(Gene Gun) 등은 아직은 실험실적인 방법에 지나지 않는다. DNA를 직접 주사하는 naked DNA 방법도 개발되었으나 세포에 이입되는 효율이 낮을 뿐만 아니라, 세포 내에

존재하는 시간이 짧아 효과지속기간이 짧다는 단점이 있다.

(1) Naked DNA

Free DNA를 직접 어떤 조직 특히, 근육 세포내에 주사하는 것을 말한다. 이 방법은 항원성이 매우 낮아 안전성이 우수하고, 조작이 간단하고, 공정·보관·품질관리가 용이하고 저렴하여 몇몇의 임상 프로토콜에 적용되었다.⁷¹⁾ 최근에 나온 데이터에 따르면 실제로 naked DNA를 사용한 유전자 치료는 비바이러스성 벡터시스템 중에는 가장 많이 사용되었고, 전체 임상 프로토콜 가운데 14% 정도를 차지하였다(Figure 1).

Naked DNA 방법은 피부유전질환의 하나로 transglutaminase 1(TGase 1)의 발현이 소실된 lamellar ichthyosis 환자에게 직접적으로 TGase DNA를 피부주사 한 결과 피부가 재생됨이 확인되었다.⁷²⁾ 그러나 TGase 1의 발현이 불규칙하고 피부가 기능적·조직학적으로 정상화시키기까지는 실패했다. 비록 DNA의 직접 주사법은 유전자 발현을 보이지만 바이러스성벡터나 리포솜 벡터보다 유전자 발현율이 낮으며 유전자의 발현이 극히 일시적이라는 단점이 있다. Naked DNA를 정맥내로 투여했을 경우에는 혈액속의 DNase에 의해 빠르게 분해되어 간으로 가게 되기 때문에 전신적으로 투여하는데 부적합하다. 결국, DNA 직접주사법은 직접 쉽게 접근할 수 있는 조직 즉, 피부나 근육에 적합하다.

Naked DNA 직접 주사법은 심혈관계 질환에서 탁월한 효과를 보인 임상결과가 발표되었다.⁷³⁻⁷⁴⁾ 궁극적으로 이 방법은 암백신(DNA 백신)을 개발하는 방향으로 갈 가능성이 크다고 보아진다.

(2) 기타

전기충격법(electroporation)은 짧고 강한(100 V/cm~1000 V/cm) 전기충격에 의해 세포막에 작은 구멍이 짧은 시간 동안 생기게 되고, 외부의 분자들은 이 구멍을 통해 세포내로 들어갈 수 있게 된다. 이때 DNA와 같은 전하를 띤 분자들은 전기장 안에서 전기영동과 유사하게 세포막을 투과해 들어갈 수 있게 된다. 피부나 간세포, 근육 등의 경우에 전기충격을 주게 되면 직접적 유전자 주사법에 비해 1000배 이상으로 발현이 증대되게 된다. 그러나 전기충격에 의한 세포손상이 문제점으로 지적되고 있다. 유전자 총은 유전자를 금가루에 붙여서 필요로 하는 세포에 쏘아 넣는 방법인데, 세포의 경우 쏘아준 세포 중 10~20%의 효율을 보였다. 이 방법의 가장 큰 약점은 투과할 수 있는 조직의 두께가 한정되어 있다는 점이다. 이 방법으로는 간과 종양에서 유전자가 잘 발현되나 목표전달이 안되고, 많은 세포에 전달할 수 없는 단점이 있다.

결 론

유전자치료제에 관련된 기반 기술로서 벡터시스템의 개발은 현 시점에서 기술 우위력 및 시장 진입력에 있어 선점할 수 있는 기회를 가질 수 있는 매우 중요한 기술로 평가되고 있으며, 최근 벡터 기술개발에 있어서 가장 중요시 되고 있는 요소는 안전성이다. 바이러스 벡터 사용으로 인한 사망 및 부작용이 보고된 바 있고,⁷⁵⁻⁷⁶⁾ 바이러스 자체가 병원성 유래로 독성, 면역원성, 염증반응을 일으킬 가능성을 가지고 있으며 유전자 삽입으로 인한 돌연변이 발생 등의 위험도 내포하기 때문이다. 따라서 최근에는 유전자 효율이 저하되어 있더라도 비바이러스성 벡터를 사용하는 기술개발이 집중되어 있으며 이에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있다.

현재 유전자치료는 암, 에이즈, 유전질환, 관절염, 다발성 경화증, 낭포성 섬유증 등 난치병 환자를 대상으로 임상실험 중이나, 인간게놈프로젝트의 완료로 유전자의 기능 연구가 이루어지면 심장병, 비만, 골다공증 등 4천여 종의 질환에 유전자치료가 적용될 수 있을 것으로 예상된다. 유전자치료제로 현재까지 승인된 제품은 없고 많은 치료제들이 초기 임상단계에 있어 현재 실제적인 시장을 예측하기는 쉽지 않지만, 유전자치료제의 시장은 일단 선두 제품이 허가 기관의 승인 후에 시장에 나온다면 후발 제품은 폭발적인 성장을 이룰 것으로 예상되고 있다. 따라서 국내 개발자들은 질병치료와 관련된 적절한 유전자가 확보되어야 하고, 우수한 유전자 운반기법의 벡터 시스템을 개발하여야 하며, 동물을 대상으로 한 전임상실험에서의 효과와 안전성을 입증받는 완벽한 치료전략이 필요하다. 이에 유전자치료의 구성 요소 중 가장 낙후된 분야로 평가받고 있는 국내의 벡터 분야기술에 대하여 박차를 가할 필요가 있다. 벡터는 안전성 검사기간이 비교적 짧으며, 투입되는 자원에 비해 산출되는 실익이 커서 상업적인 이점이 많은 편이다. 따라서 이 분야의 기술력 없이는 사실상 상품화가 곤란하다고 볼 수 있으며, 이 분야에 특히 기술개발력이 집중되어야 할 것으로 보인다.

문 헌

- 1) E. Marshall, Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, **286**, 2244-2245 (1999).
- 2) E. Marshall, Clinical research. Gene therapy a suspect in leukemia-like disease. *Science*, **298**, 34-35 (2002).
- 3) A. El-Aneed, An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J. Control Release*, **94**, 1-14 (2004).
- 4) L.E. Michael, R.A. Mohammad, W. Jo and M.E. Richard, Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J. Gene Med.*, **6**, 597-602 (2004).

- 5) G. Daly and Y. Chernajovsky, Recent developments in retroviral-mediated gene transduction. *Mol. Ther.*, **2**, 423-434 (2000).
- 6) R.J. Rigg, J. Chen, J.S. Dando, S. P. Forestell, I. Plavec and E. Bohnlein, A novel human amphotropic packaging cell line: high titer, complement resistance, and improved safety. *Virology*, **218**, 290-295 (1996).
- 7) S.H. Chen, H.D. Shine, J.C. Goodman, R.G. Grossman and S.L. Woo, Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 3054-3057 (1994).
- 8) G.L. Clayman, A.K. el-Naggar, J.A. Roth, W.W. Zhang, H. Goepfert, D.L. Taylor and T.J. Liu, *In vivo* molecular therapy with p53 adenovirus for microscopic residual head and neck squamous carcinoma. *Cancer Res.*, **55**, 1-6 (1995).
- 9) T. Fujiwara, M. Kataoka and N. Tanaka. Adenovirus-mediated p53 gene therapy for human cancer. *Mol. Urol.*, **4**, 51-54 (2000).
- 10) S.J. Tebbutt, Technology evaluation: AAV-CFTR vector, targeted genetics. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **1**, 524-529 (1999).
- 11) H. Nakai, R.W. Herzog, J.N. Hagstrom, J. Walter, S.H. Kung, E.Y. Yang, S.J. Tai, Y. Iwaki, G.J. Kurtzman, K.J. Fisher, P. Colosi, L.B. Couto and K.A. High, Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of human blood coagulation factor IX into mouse liver. *Blood*, **91**, 4600-4607 (1998).
- 12) E. Poeschla, P. Corbeau and F. Wong-Staal, Development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 11395-11399 (1996).
- 13) E. Gouze, R. Pawliuk, C. Pilapil, J.N. Gouze, C. Fleet, G.D. Palmer, C.H. Evans, P. Leboulch and S.C. Ghivizzani, In vivo gene delivery to synovium by lentiviral vectors. *Mol. Ther.*, **5**, 397-404 (2002).
- 14) K. Takahashi, T. Luo, Y. Saishin, Y. Saishin, J. Sung, S. Hackett, R.K. Brazzell, M. Kaleko and P.A. Campochiaro, Sustained transduction of ocular cells with a bovine immunodeficiency viral vector. *Hum. Gene Ther.*, **13**, 1305-1316 (2002).
- 15) T.J. Oligino, Q. Yao, S.C. Ghivizzani and P. Robbins, Vector systems for gene transfer to joints. *Clin. Orthop.*, **379** Suppl, S17-30 (2000).
- 16) C. Torrent, C. Jullien, D. Klatzmann, M. Perricaudet and P. Yeh, Transgene amplification and persistence after delivery of retroviral vector and packaging functions with E1/E4-deleted adenoviruses. *Cancer Gene Ther.*, **7**, 1135-1144 (2000).
- 17) M. Urashima, H. Suzuki, Y. Yuza, M. Akiyama, N. Ohno, Y. Eto, An oral CD40 ligand gene therapy against lymphoma using attenuated Salmonella typhimurium. *Blood*, **95**, 1258-1263 (2000). Erratum in: *Blood* **95**, 3652 (2000).
- 18) L.M. Zheng, X. Luo, M. Feng, Z. Li, T. Le, M. Ittensohn, M. Trailsmith, D. Bermudes, S.L. Lin and I.C. King, Tumor amplified protein expression therapy: Salmonella as a tumor-selective protein delivery vector. *Oncol. Res.*, **12**, 127-135 (2000).
- 19) D. Deshpande, P. Blezinger, R. Pillai, J. Duguid, B. Freimark

- and A. Rolland, Target specific optimization of cationic lipid-based systems for pulmonary gene therapy. *Pharm. Res.*, **15**, 1340-1347 (1998).
- 20) F. Liu and L. Huang, Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *J. Control Release.*, **78**, 259-266 (2002).
- 21) Y.K. Song and D. Liu, Free liposomes enhance the transfection activity of DNA/lipid complexes in vivo by intravenous administration. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1372**, 141-150 (1998).
- 22) J.J. Wheeler, L. Palmer, M. Ossanlou, I. MacLachlan, R.W. Graham, Y.P. Zhang, M.J. Hope, P. Scherrer and P.R. Cullism, Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization. *Gene Ther.*, **6**, 271-281 (1999).
- 23) O. Zelphati, Y. Wang, S. Kitada, J.C. Reed, P.L. Felgner and J. Corbeil, Intracellular delivery of proteins with a new lipid-mediated delivery system. *J. Biol. Chem.*, **276**, 35103-35110 (2001).
- 24) P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold and M. Danielsen, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**, 7413-7417 (1987).
- 25) H. Kamiya, H. Akita and H. Harashima, Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in gene therapy. *Drug Discov. Today*, **8**, 990-996 (2003).
- 26) R.I. Mahato, A. Rolland and E. Tomlinson, Cationic lipid-based gene delivery systems: pharmaceutical perspectives. *Pharm. Res.*, **14**, 853-859 (1997).
- 27) K.D. Lee, Y.K. Oh, D.A. Portnoy and J.A. Swanson, Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from *Listeria monocytogenes*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 7249-7452 (1996).
- 28) D.S. Friend, D. Papahadjopoulos, R.J. Debs, Endocytosis and intracellular processing accompanying transfection mediated by cationic liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1278**, 41-50 (1996).
- 29) X. Zhou and L. Huang, DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1189**, 195-203 (1994).
- 30) M.S. Hong, S.J. Lim, Y.K. Oh and C.K. Kim, pH-sensitive, serum-stable and long-circulating liposomes as a new drug delivery system. *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**, 51-58 (2001).
- 31) A. Kichler, C. Leborgne, E. Coeytaux and O. Danos, Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *J. Gene Med.*, **3**, 135-144 (2001).
- 32) A.R. Klemm, D. Young and J.B. Lloyd, Effects of polyethyleneimine on endocytosis and lysosome stability. *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 41-46 (1998).
- 33) C. Plank, B. Oberhauser, K. Mechtler, C. Koch and E. Wagner, The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J. Biol. Chem.*, **269**, 12918-12924 (1994).
- 34) E. Wagner, Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **38**, 279-289 (1999).
- 35) S. Simoes, V. Slepishkin, E. Pretzer, P. Dazin, R. Gaspar, M.C. Pedrosa de Lima and N. Duzgunes, Transfection of human macrophages by lipoplexes via the combined use of transferrin and pH-sensitive peptides. *J. Leukoc. Biol.*, **65**, 270-279 (1999).
- 36) T.B. Wyman, F. Nicol, O. Zelphati, P.V. Scaria, C. Plank and Jr. F.C. Szoka, Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry*, **36**, 3008-3017 (1997).
- 37) D. Lechardeur, K.J. Sohn, M. Haardt, P.B. Joshi, M. Monck, R.W. Graham, B. Beatty, J. Squire, H. O'Brodovich and G.L. Lukacs, Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther.*, **6**, 482-497 (1999).
- 38) D. Lechardeur and G.L. Lukacs, Intracellular barriers to non-viral gene transfer. *Curr. Gene Ther.*, **2**, 183-194 (2002).
- 39) W.C. Tseng, F.R. Haselton and T.D. Giorgio, Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1445**, 53-64 (1999).
- 40) M.G. Sebestyen, J.J. Ludtke, M.C. Bassik, G. Zhang, V. Budker, E.A. Lukhtanov, J.E. Hagstrom and J.A. Wolff, DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 80-85 (1998).
- 41) M.A. Zanta, P. Belguise-Valladier and J.P. Behr, Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 91-96 (1999).
- 42) A. Subramanian, P. Ranganathan and S.L. Diamond, Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of nondividing mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 873-877 (1999).
- 43) J.J. Ludtke, G. Zhang, M.G. Sebestyen and J.A. Wolff, A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA. *J. Cell Sci.*, **112**, 2033-2041 (1999).
- 44) C.K. Chan and D.A. Jans, Using nuclear targeting signals to enhance non-viral gene transfer. *Immunol. Cell Biol.*, **2**, 119-130 (2002).
- 45) T. Nagasaki, T. Myohoji, T. Tachibana, S. Futaki and S. Tamagaki, Can nuclear localization signals enhance nuclear localization of plasmid DNA. *Bioconjug. Chem.*, **14**, 282-286 (2003).
- 46) R. Kircheis, L. Wightman, A. Schreiber, B. Robitza, V. Rossler, M. Kurska and E. Wagner, Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther.*, **8**, 28-40 (2001).
- 47) N. Shi, W.M. Pardridge, Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 7567-7572 (2000).
- 48) M.A. Monck, A. Mori, D. Lee, P. Tam, J.J. Wheeler, P.R. Cullism and P. Scherrer, Stabilized plasmid-lipid particles: pharmacokinetics and plasmid delivery to distal tumors following intravenous injection. *J. Drug Target.*, **7**, 439-452 (2000).
- 49) H. Kiwada, H. Matsuo and H. Harashima, Identification of proteins mediating clearance of liposomes using a liver

- perfusion system. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **32**, 61-79 (1998).
- 50) N. Shi, Y. Zhang, C. Zhu, R.J. Boado and W.M. Pardridge, Brain-specific expression of an exogenous gene after i.v. administration. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 12754-12759 (2001).
 - 51) S.C. De Smedt, J. Demeester and W.E. Hennink, Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharm. Res.*, **17**, 113-126 (2000).
 - 52) X. Gao and L. Huang, Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry*, **35**, 1027-1036 (1996).
 - 53) M. Ogris, S. Brunner, S. Schuller, R. Kircheis and E. Wagner, PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther.*, **6**, 595-605 (1999).
 - 54) S. Mansouri, P. Lavigne, K. Corsi, M. Benderdour, E. Beaumont and J.C. Fernandes, Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **57**, 1-8 (2004).
 - 55) Y.K. Oh, J.P. Kim, H. Yoon, J.M. Kim, J.S. Yang and C.K. Kim, Prolonged organ retention and safety of plasmid DNA administered in polyethylenimine complexes. *Gene Ther.*, **8**, 1587-1592 (2001).
 - 56) S.G. Martin and J.C. Murray, Gene-transfer systems for human endothelial cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **41**, 223-233 (2000).
 - 57) P.Y. Kuo and W.M. Saltzman, Novel systems for controlled delivery of macromolecules. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **6**, 59-73 (1996).
 - 58) J. Zabner, A.J. Fasbender, T. Moninger, K.A. Poellinger and M.J. Welsh, Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.*, **270**, 18997-9007 (1995).
 - 59) M.C. Garnett, Gene-delivery systems using cationic polymers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **16**, 147-207 (1999).
 - 60) D.T. Curiel, E. Wagner, M. Cotten, M.L. Birnstiel, S. Agarwal, C.M. Li, S. Loechel and P.C. Hu, High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus coupled to DNA-polylysine complexes. *Hum. Gene Ther.*, **3**, 147-154 (1997).
 - 61) A. El-Aneed, An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J. Control. Release.*, **94**, 1-14 (2004).
 - 62) A.M. Haines, A.S. Irvine, A. Mountain, J. Charlesworth, N.A. Farrow, R.D. Husain, H. Hyde, H. Ketteringham, R.H. McDermott, A.F. Mulcahy, T.L. Mustoe, S.C. Reid, M. Rouquette, J.C. Shaw, D.R. Thatcher, J.H. Welsh, D.E. Williams, W. Zauner and R.O. Phillips, CL22 - a novel cationic peptide for efficient transfection of mammalian cells. *Gene Ther.*, **8**, 99-110 (2001).
 - 63) N. Ohmori, T. Niidome, T. Kiyota, S. Lee, G. Sugihara, A. Wada, T. Hirayama and H. Aoyagi, Importance of hydrophobic region in amphiphilic structures of alpha-helical peptides for their gene transfer-ability into cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245**, 259-265 (1998).
 - 64) D.L. McKenzie, E. Smiley, K.Y. Kwok and K.G. Rice, Low molecular weight disulfide cross-linking peptides as nonviral gene delivery carriers. *Bioconjug. Chem.*, **11**, 901-909 (2000).
 - 65) T. Niidome, M. Urakawa, H. Sato, Y. Takahara, T. Anai, T. Hatakayama, A. Wada, T. Hirayama and H. Aoyagi, Gene transfer into hepatoma cells mediated by galactose-modified alpha-helical peptides. *Biomaterials*, **21**, 1811-1819 (2000).
 - 66) T. Niidome, K. Takaji, M. Urakawa, N. Ohmori, A. Wada, T. Hirayama and H. Aoyagi, Chain length of cationic alpha-helical peptide sufficient for gene delivery into cells. *Bioconjug. Chem.*, **10**, 773-780 (1999).
 - 67) H.H. Kim, W.S. Lee, J.M. Yang and S. Shin, Basic peptide system for efficient delivery of foreign genes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1640**, 129-36 (2003).
 - 68) C. Plank, M.X. Tang, A.R. Wolfe, Jr. F.C. Szoka, Branched cationic peptides for gene delivery: role of type and number of cationic residues in formation and in vitro activity of DNA polyplexes. *Hum. Gene Ther.*, **10**, 319-32 (1999).
 - 69) K. Rittner, A. Benavente, A. Bompard-Sorlet, F. Heitz, G. Divita, R. Brasseur and E. Jacobs, New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol. Ther.*, **5**, 104-114 (2002).
 - 70) P. Yotnda, D.H. Chen, W. Chiu, P.A. Piedra, A. Davis, N.S. Templeton and M.K. Brenner, Bilamellar cationic liposomes protect adenovectors from preexisting humoral immune responses. *Mol. Ther.*, **5**, 233-241 (2002).
 - 71) J.A. Wolff, R.W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani and P.L. Felgner, Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, **247**, 1465-1468 (1990).
 - 72) K.A. Choate and P.A. Khavari, Direct cutaneous gene delivery in a human genetic skin disease. *Hum. Gene Ther.*, **8**, 1659-1665 (1997).
 - 73) J.F. Symes, Gene therapy for ischemic heart disease: therapeutic potential. *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, **1**, 159-166 (2001).
 - 74) E. Teiger, I. Deprez, V. Fataccioli, S. Champagne, J.L. Dubois-Rande, M. Eloit and S. Adnot, Gene therapy in heart disease. *Biomed. Pharmacother.*, **55**, 148-154 (2001).
 - 75) N. Somia and I.M. Verma, Gene therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.*, **1**, 91-99 (2000).
 - 76) D. Ferber, Gene therapy. Safer and virus-free. *Science*, **294**, 1638-1642 (2001).