

## Naked Plasmid DNA를 이용한 빈혈 치료용 Direct Gene Transfer 시스템의 개발에 대한 연구

박 영 십 · 정 동 건 · † 최 차 용  
서울대학교 공과대학 협동과정 생물화학공학전공  
(접수 : 2004. 6. 29., 게재승인 : 2004. 9. 30.)

### Studies on Developing Direct Gene Transfer Based on Naked Plasmid DNA for Treating Anemia

Young Seoub Park, Dong Gun Jung, and Cha-yong Choi†  
Interdisciplinary Programs for Biochemical Engineering and Biotechnology, Seoul National University,  
302-615 Shinlim-9dong, Kwanak-ku, Seoul 151-744, Korea  
(Received : 2004. 6. 29., Accepted : 2004. 9. 30.)

Several gene delivery therapies are being developed for treatment of serum protein deficiency. EPO is one of the most promising therapeutic agent for this treatment which is currently being investigated in depth. This study has the ultimate purpose of improving the gene delivery system for an increase of red blood cell production. A plasmid DNA was constructed smaller than other plasmids for an increase in penetration into animal cells, and two genes were cloned into each vector as a co-delivery system to express erythropoietin, and interleukin-3 or thrombopoietin, which can act on erythroid cell, thus activating hematopoiesis synergically. This co-delivery system has an advantage of decreasing the labour required for industrial production of DNA vaccine. A new plasmid vector, pVAC, in size 2.9 kb, was constructed with the essential parts from PUC 19 and pSectagB, which is much smaller than other plasmid vector and is the size of 2.9 kb. Co-delivery system was constituted by cloning human erythropoietin with each of human interleukin-3 gene or human thrombopoietin gene into both pVAC and pSectagB. As a result, the transfection efficiency of pVAC was higher than that of pSectagB in vitro, and hematocrit level of the mice injected with pVAC is higher than that of other mice. And co-delivery system, made of several plasmid DNAs, was expressed in vitro.

**Key Words** : DNA vaccine, plasmid DNA, human erythropoietin (hEPO), human interleukin3 (hIL-3), human thrombopoietin (hTPO), *in vitro* transfection, *in vivo*, hematocrit

#### 서 론

현재 A형 혈우병, 진성 당뇨병, erythropoietin (EPO)-responsive anemia 등의 선천성 혹은 후천성 혈청 단백질 결핍증을 치료하기 위해 해당 혈청 단백질이나 재조합 단백질을 정맥 혹은 피하로 반복적으로 주입하므로 치료하고 있다. 특히 만성 신부전증 환자에게 자주 나타나는 악성 빈혈의 경우 recombinant human erythropoietin (rhEPO)의 접종이 효과를 보이는 것으로 보고되고 있다. 약물동태학

연구에 따르면 피하주사된 rhEPO이 정맥주사된 것보다 serum EPO 농도는 낮지만 낮은 흡수 속도 때문에 더 오랜 기간 체내에 존재하는 것으로 나타났다(1-3). 하지만 이러한 치료는 좋은 효과에도 불구하고 rhEPO의 가격이 매우 비싸고 자가 접종의 불편함이 단점으로 지적된다. 이러한 특징은 다른 단백질에 대한 치료에서 공통적으로 존재하는 문제점이다(1-3). 이러한 문제점들을 해결하면서 혈청 단백질 결핍증을 효과적으로 치료하기 위해 여러 가지 방법의 gene delivery therapy (유전자 전달 치료)가 연구되고 있다. gene delivery therapy 방법은 크게 *ex vivo* 방식과 *in vivo* 방식으로 나눌 수 있다.

먼저 *ex vivo* 방식은 환자의 primary human myoblast를 isolation 한 후 *in vitro*에서 특정 유전자를 발현할 수 있도록 유전적으로 변형시킨 후 다시 환자에게 이식하는 방법

† Corresponding Author : School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-744, Korea  
Tel : +82-2-880-7071, FAX : +82-2-888-1604  
E-mail : choicy@snu.ac.kr

이다(4). 이 방법은 1년 이상의 장기간 동안 효과가 있다고 보고되고 있지만 과정이 복잡하고 비용이 많이 든다. 이에 비해 naked plasmid vector나 viral vector에 원하는 유전자를 삽입하여 체내에 직접 투여하는 *in vivo* 방식은 비용면에서 저렴하고 치료과정이 빠르며 환자에게 불편함이 적다. *in vivo* transfer를 위해서 플라스미드 DNA vector, replication-defective adenovirus vector와 adeno-associated virus vector 등이 사용된다.

대표적인 DNA delivery system인 viral vector를 이용한 방법은 전달과 발현에 높은 효과를 보이는 것은 분명하다. 그러나 독성 문제, 세포 형식에 제한, DNA 운반 능력의 한계, 체내에서 virus production과 package 문제 그리고 높은 비용 등의 단점을 지니고 있다. 이에 반해 플라스미드 DNA 벡터는 독성과 면역 반응에 대한 안정성, 구성과 생산의 간편함에 따르는 비용절감, 환자에게 주입의 용이성, 특정 부위 혹은 세포에 국부적인 적용 등의 장점을 가지고 있다. 1990년 Wolff 그룹에 의해 근육주사된 플라스미드 DNA가 skeletal myocyte에 침투해서 19개월 동안 발현되는 것을 관찰한 이래로 많은 연구에서 다양한 방법으로 실험이 이루어져 왔다(5-7).

Plasmid DNA delivery system을 통한 gene delivery therapy에 있어서 두가지 해결해야 할 점은 낮은 효율성과 지속적이면서 알맞은 양의 gene을 발현 할 수 있는 조절 시스템의 구축이라고 할 수 있다(1).

Naked plasmid DNA delivery system에 있어서 주입된 DNA의 90% 이상이 세포 내의 핵으로 전달되지 못하는 낮은 전달 효율은 시급히 극복해야 할 과제라고 할 수 있다. 이점을 개선하기 위해 먼저 DNA가 전달되는 과정을 고려할 수 있다. DNA가 외부에서 핵까지 전달되는 과정은 크게 세 단계로 나눌 수 있고, 각 단계에 발생할 수 있는 문제점에 vector의 구조와 주입 방법의 개선으로 해결하는 연구가 진행 중이다(8).

구조적인 면을 볼 때 세포로의 uptake를 많이 하기 위해 벡터 사이즈를 작게 하고 viral nuclear localization signal (NLS)과 퓨전 단백질을 발현하도록 해서 nuclear targeting을 증가시키는 방법이 있다(9).

전달 과정 측면에서 볼 때 가장 선호되는 방법은 근육주사 부위를 절제하고 전기충격을 가해서 근육세포로 플라스미드 DNA를 uptake하는 효율을 높이는 Electroporation 방법이다(10). Electroporation과 동시에 Hyaluronidase와 같은 cell extracellular matrix를 약화시키는 물질과 plasmid DNA를 함께 주사하는 방법도 연구되고 있다(11). 또, DNA가 안정한 상태를 유지하기 위해 polyethylene glycol (PEG), polyvinyl pyrrolidone (PVP), poly (lactide-co-glycolide) matrix와 같은 non-ionic polymer carrier, 또는 pluronics L61과 F127 두 가지의 poloxamer combination을 사용하여 근육세포의 plasmid DNA uptake 효율을 증가시키거나(11, 12), DEAE-dextran, calcium phosphate, dendrimer 등으로 복합물을 형성하여 전달 과정 동안 안정성이 증가될 수 있다(13). 그 외에도 adjuvant를 이용해서 효과를 증대시킬 수 있고, 두 개의 gene이나 혹은 복합 단백질의 gene으로 vector를 구성하는 combining DNA vaccine도 최근 연구가 활발히

진행 중이다(14).

효과적이고 안정적인 전달과 아울러 DNA가 전달되는 과정을 전반적으로 통제할 수 있는 조절 시스템의 개발이 최근 이루어지고 있다. 주로 이러한 조절 시스템은 engineered transcription factor를 기본으로 하고 있는데, 이것은 예를 들면 doxycycline이나 rapamycin 등의 small molecule drug에 의해 작동되며 전달되고자 하는 유전자의 발현이 이 transcription factor에 의해 조절되므로 궁극적으로 환자는 위의 drug을 조절하므로 전달 유전자의 발현을 조절할 수 있는 시스템이다.

EPO는 만성 신부전증 등에 의한 빈혈 치료제로 이미 사용되고 있지만 분리 정제가 어렵고 따라서 비용이 많이 드는 치료제이므로 rhEPO를 플라스미드 벡터에 삽입하여 유전자 자체를 전달하는 DNA vaccine의 개발은 매우 유용하다. 그런데 체내 단백질 결핍을 치료하기 위한 gene delivery system으로 naked 플라스미드 DNA는 많은 장점이 있지만 viral 벡터에 비해 낮은 효율성을 증대시킬 필요가 있다. 이러한 효율 증대를 위해 다음과 같은 시도를 하였다. 먼저 플라스미드 DNA의 세포로의 침투량을 증가시키기 위해 작은 크기의 플라스미드 벡터를 고안하였다. 이 새로운 벡터는 기존의 벡터를 기본으로 하여 삽입한 gene을 발현하기 위한 기능을 수행할 기본적인 구조 이외의 것을 제거하여 제작하였고 이름은 pVAC이라 붙였다. 이 벡터와 크기가 큰 기존의 벡터에 rhEPO를 넣어 *in vitro*와 *in vivo*에서의 효과를 관찰하였다.

그리고 EPO와 함께 적혈구 생산에 기여할 수 있는 rhIL-3와 rhTPO를 각각의 벡터 넣거나 혹은 한 개의 벡터 동시에 넣어 궁극적으로 체내에서 두 가지 인자에 의한 적혈구 생산의 증대를 기대할 수 있는 co-delivery system을 구성하였다. 특히 두 개의 유전자를 동시에 한 개의 플라스미드 벡터에 삽입하여 체내에서 발현시키는 방법은 cocktail method라고 불리며 두 가지 유전자에 의한 시너지 효과를 기대할 수 있고, 한 개의 vaccine의 제조 공정으로 두 개의 vaccine의 역할을 하므로 산업적인 제조 과정에서 발생할 수 있는 기술적인 문제점과 공정을 감소시키는 장점이 있다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 효소

hIL-3는 전북대학교 Cytokine은행에서 제공받았고, hTPO는 일본 핫카이도 의대의 타케시 콘도 연구진에 의해 제공받았다.

제한효소는 Poscochem과 New England Biolabs, Inc (NEB)에서 구입하였고, T4 DNA ligase는 NEB에서 구입하였다. vent DNA polymerase를 비롯한 PCR 관련 시약은 NEB에서 구입하였다. PCR primer 제조를 위한 DNA 합성은 COSMO사에 의뢰하여 합성하였고, DNA sequencing은 (주)마크로젠에 의뢰하여 분석하였다. 새로운 플라스미드 벡터인 pVAC cloning에 사용한 pSecTagB는 Invitrogen에서 구입하였으며, PUC19은 Promega에서 구입하였다.

plasmid vector의 회득과 분리는 QIAGEN®의 plasmid

purification kit 시리즈를 사용하였다. 동물세포 배양을 위한 Fetal Bovine Serum (FBS)과 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)은 Gibco BRL. 제품을, in vitro transfection 은 QIAGEN® Effectine™ trasfection kit을 사용하였다. EPO 와 IL-3 ELISA 분석을 위해서는 Roche human EPO ELISA kit와 BD Biosciences의 BD OptEIA ELISA set을 사용하였다. 그 밖의 다른 모든 시약은 분석 등급이나 1등급으로 구입하여 사용하였다.

**Mice and Cell line**

DNA vaccine vector를 대량으로 얻기 위해 사용한 균주는 DH5a를 이용하였고 Invitrogen에서 구입하였다. in vitro 실험을 위해 사용된 NIH-3T3 (mouse fibroblast)와 COS-7 (monkey kidney) cell line은 한국 세포주은행에서 구입하였다. in vivo 실험에 사용한 mice는 5주령의 female BALB/c로 서울대학교 동물사육장에서 구입하고 그 곳에서 보관 하면서 실험하였다.

**Animal cell culture**

동물세포인 NIH-3T3와 COS-7은 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum에서 계대배양 방법으로 키웠다. 먼저 seed 를 DMEM 배지가 들어있는 한 개의 plate에 접종하여 5% CO<sub>2</sub> - 95% air로 유지되고 있는 CO<sub>2</sub> 배양기에서 37℃로 배양시켰다. 세포가 plate 표면을 80% 이상 덮힌 상태까지 자라게 되면 cell scraper로 긁어내어 계대배양하거나 스토리지 하였다.

Table 1. Sense and anti-sense primers for PCR reaction

hEPO	sense	5'... AAAAAAAAAAGCTTGGGGTGCACGAA └HindIII┘ TGTCCTGCC ...3'(35)
	anti-sense	5'...AAAAAAATCTAGATCATCTGTCCCC └Xba I┘ TGTCCTGCAGGC ...3'(38)
hIL-3	sense	5'...TTTTTTTGGTACCGATCCAACATGAGC └Kpn I┘ CGCCTGCC...3'(37)
	anti-sense	5'...TTTTTTTCTAGACTAAAAGATCGCGAG └Xba I┘ GCT...3'(31)
hTPO	sense	5'...TTTTTTTAAAGCTTAGAGGGGCTGCCT └HindIII┘ GCTGTGCA...3'(36)
	anti-sense	5'...TTTTTTTCTAGAGATGTCGGCAGG └Xba I┘ CAGTGTCTGAGA...3'(36)
promoter-insert-terminator	sense	5'...TTTTTTTATAGATCTCGATGTACGGGC └Bgl II┘ CAGAT...3'(33)
	anti-sense	5'...TTTTTTTATAGATCTTCCCAGCATGCCT └Bgl II┘ GCT...3'(33)
For sequencing	sense	5'... AAATTAATACGACTCACTAT...3'(20)
	anti-sense	5'...CAAATTTGGGCGACTAGTCG...3'(20)

**pVAC-hEPO와 pSectagB-hEPO의 제조**

각 vector에 들어간 항원 유전자는 single strand DNA를 hybridization시킨 뒤 ligation 시켰다. 플라스미드 p64T-hEPO를 template로 하여 hEPO이 coding sequence 부분을 적절한 primer(Table 1)를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 통해 증폭하였다.

p64T-hEPO를 PCR을 통해 5'에 HindIII 인식부위를, 3'에 Xba I 인식부위가 포함된 hEPO를 제조하였고, 이 DNA를 제한효소 HindIII/Xba I 처리하여 양 말단이 잘린 PCR product를 얻었다. 플라스미드 pVAC과 pSectagB를 제한효소 HindIII/Xba I로 처리한 후 위에서 얻은 PCR product와 ligation 반응을 통해 pVAC-hEPO를 제조하였다. 제작된 플라스미드 pVAC-hEPO와 pSectagB-hEPO를 competent cell (E.coli DH5a)에 transformation한 뒤 miniprep을 통해 얻은 DNA를 제한효소 처리와 적절한 primer(Table 1)을 이용한 sequencing으로 확인하였다.

**pVAC-hIL3와 pSectagB-hIL3의 제조**

제작 방식은 위의 pVAC-hEPO와 pSectagB-hEPO의 방식과 동일하다. 플라스미드 pGEMT-IL3를 template로 하여 hIL-3의 coding sequence 부분을 적절한 primer(Table 1)를 이용하여 PCR을 통해 증폭하였다.

pGEMT-hIL3를 PCR을 통해 5'에 Kpn I 인식부위를, 3'에 Xba I 인식부위가 포함된 hIL-3를 제조하였고, 이 DNA를 제한효소 Kpn I/Xba I 처리하여 양 말단이 잘린 PCR product를 얻었다. 플라스미드 pSectagB와 pVAC를 제한효소 Kpn I/Xba I로 처리한 후 위에서 얻은 PCR product와 ligation 반응을 통해 pVAC-hIL3와 pSectagB-hIL3를 각각 제조하였다. 이하 DNA 획득과정과 확인과정은 pVAC-hEPO의 방법과 동일하다.

**pVAC-hTPO와 pSectagB-hTPO의 제조**

제작 방식은 위의 pVAC-hEPO와 pSectagB-hEPO의 방식과 동일하다. 플라스미드 pT7-hTPO를 template로 하였고, PCR를 통해 5'에 Hind III인식부위를, 3'에 Xba I 인식부위가 포함된 hTPO를 제조하였다. 플라스미드 pVAC과 pSectagB를 각각 제한효소 HindIII/Xba I로 처리한 후 위에서 얻은 PCR product와 ligation 반응을 통해 pVAC-hIL3와 pSectagB-hIL3를 각각 제조하였다. 이하 DNA 획득과정과 확인과정은 pVAC-hEPO의 방법과 동일하다.

**pVAC-hEPO-hIL3와 pSectagB-hEPO-hIL3의 제조**

위에서 만들어진 pSectagB-hIL3에서 promoter-hIL3-terminator를 포함하는 DNA 조각을 PCR을 통해 얻기 위한 적절한 primer(Table 1)를 제작하였다. 이 primer를 이용한 PCR을 통해 양끝이 BglII의 제한효소 위치를 가지는 삽입 조각을 제작하였다. 그리고 pVAC-hEPO를 BglII로 제한효소 처리한 뒤 위의 삽입 조각과 ligation하여 pVAC-hEPO-hIL3와 pSectagB-hEPO-hIL3를 제조하였다. 제작된 plasmid DNA는 BglII로 제한효소 처리하여 크기를 확인하고, PCR을 통해 hEPO, hIL-3의 존재를 확인하였다.

### pVAC-hEPO-hTPO와 pSectagB-hEPO-hTPO의 제조

위의 pVAC-hEPO-hIL3의 제조 방식과 동일하다. pSectagB-hEPO-hTPO를 template로 사용하였고 사용한 primer, 삽입조각 양끝의 제한 효소 그리고 획득과정과 확인과정은 pVAC-hEPO-hIL3의 방식과 동일하다.

### in vitro assay

동물세포 NIH-3T3와 COS-7를 6-well plate에 계대배양한 후 transfection을 위한 적절한 농도인  $2 \times 10^6$  cells/ml이 될 때까지 배양하였다. 먼저 최적의 transfection 조건을 얻기 위해 pCMV-GFP (Green Fluorescence Protein)을 이용하여 실험을 실시하였다. 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 pCMV-GFP를 포함하는 TE를 양을 다르게 하여 transfection시켰다. DNA의 양은 각각 0.4/1/2/4/8  $\mu\text{g}$ 에 맞추고 DNA-condensation buffer를 가해 부피가 100  $\mu\text{l}$ 이 되게 한 뒤 enhancer 8  $\mu\text{l}$ 를 넣고 1초간 vortexing하였다. 실온에서 약 5분간 반응시킨 후 10  $\mu\text{l}$ 의 effectene transfection reagent를 넣고 약 10초간 vortexing하고 10분간 실온에서 반응시켰다. 이때 동물세포가 자라고 있는 6-well plate를 PBS로 세척하고 각 well에 DMEM 배지 1.6 ml를 넣어 준비하였다. 위의 DNA용액에 DMEM 배지 0.6 ml를 가하고 이것을 각 well에 조심스럽게 섞어주었다. transfection 24시간 후에 NIKON TE300 Fluorescence Microscope를 통해 GFP의 발현 정도를 관찰하였다.

위의 실험에서 확인된 최적화 조건에 따라 각 플라스미드 DNA 2  $\mu\text{g}$ 을 transfection 시키고 24시간 후에 상등액에 대해 hEPO와 hIL-3 ELISA를 각각의 protocol에 의거 시행하여 발현량을 측정하였다.

### in vivo assay

각각의 플라스미드 DNA의 농도가 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 가 되도록 PBS에 녹여 준비하였다. 그리고 각 플라스미드 DNA 100  $\mu\text{g}$ 을 6주령 female Balb/c의 tribialis anterior (대퇴상두근)에 근육주사하고 1주 후에 orbital venipuncture (안하정맥총)을 통해 채혈하였다. 채혈된 혈액은 모세관에 담아 한쪽을 봉한 후 Hawksley Micro-hematocrit Centrifuge로 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 Hawksley Micro-hematocrit Reader로 hematocrit을 측정하였다. hEPO ELISA는 혈액을 상온에서 약 30분간 놓아둔 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 serum을 분리한 후 실시하였다.

## 결 과

### Transfection 최적화

Blue monkey의 kidney cell line인 COS 7과 mouse의 fibroblast cell line인 NIH 3T3을 이용해 pVAC-hEPO와 pSectagB-hEPO의 in vitro에서의 발현량을 실험하였다. 이에 앞서 transfection 조건의 최적화를 위해 DNA 농도가 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 인 pCMV-GFP를 이용해 플라스미드 DNA의 양을 변화시키면서 GFP의 발현정도를 NIKON TE300 Fluorescence Microscope로 관찰하였다. 플라스미드 DNA가 세포에 침투하여 실험결과 DNA 양이 2~4  $\mu\text{g}$ 일 때 GFP의 발현량이

가장 높게 나타나는 것을 확인하였다.

### in vitro assay

먼저 위 최적화 조건에 따라 pVAC, pVAC-hEPO, pSectagB-hEPO DNA 2.0  $\mu\text{g}$ 을 NIH-3T3와 COS-7 세포에 transfection하였다. 24시간 후 EPO ELISA를 실시하여 hEPO 발현량을 비교하였다.

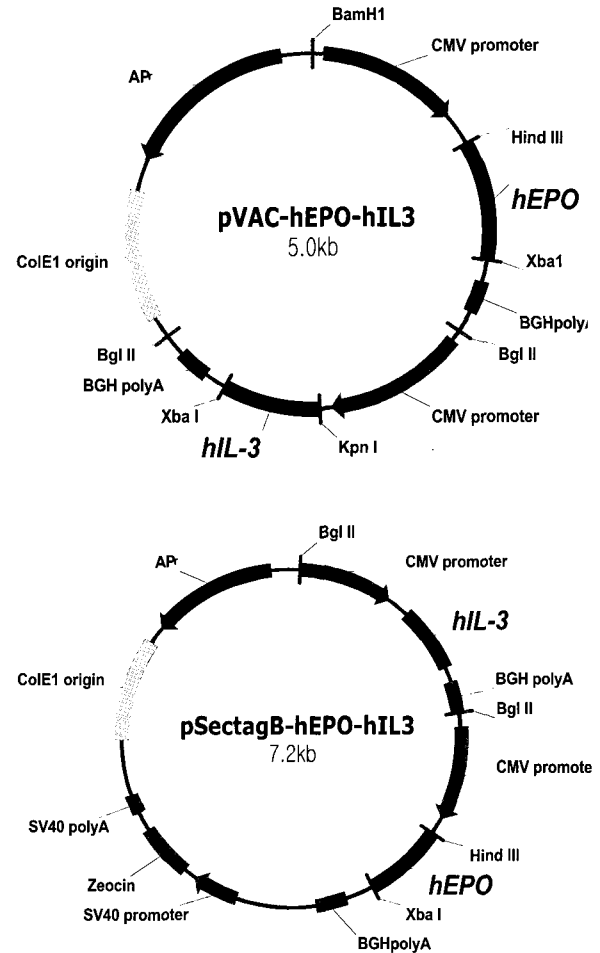


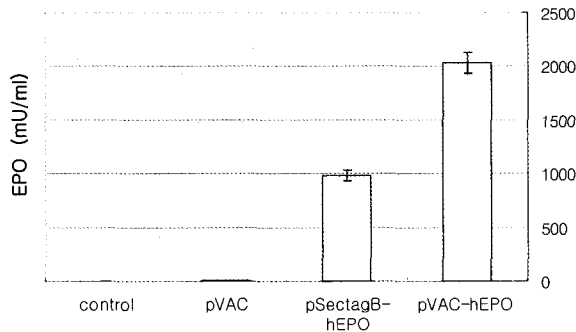
Figure 1. Schematic illustration of pVAC-hEPO-hIL3 and pSectagB-hEPO-hIL3.

pVAC-hEPO의 EPO 발현량이 pSectagB-hEPO보다 COS-7에서는 2배(Fig. 2(a)), NIH-3T3이 경우 4배(Fig. 2(b)) 높게 나왔다. 플라스미드 벡터가 동일한 구성요소를 가지면서 같은 양이 transfection되었을 때 세포에 uptake되는 효율을 크기만 감소시켜도 증가시킬 수 있다는 결론을 내렸다.

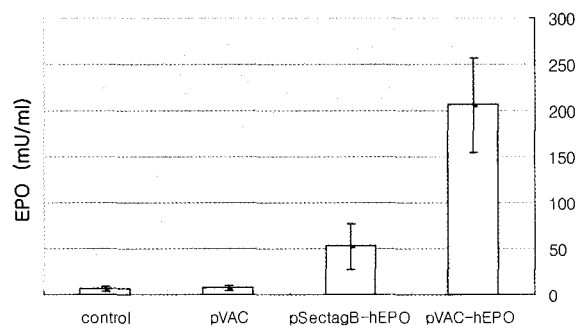
그리고 이러한 경량화 된 벡터에는 두 개 이상의 gene을 삽입하여도 크기에 있어 여유가 있으므로 뒤이어 실시한 co-delivery system을 구성하기 위한 플라스미드 DNA에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단하였다.

또한 실험 결과 NIH-3T3에서의 발현량이 COS-7에서의 것보다 양이 적고 편차가 큰 현상을 발견할 수 있었다. 그 이유는 NIH-3T3가 fibroblast cell line으로 cell 외부의 cellular matrix 구조가 kidney cell line인 COS 7에 비해 견

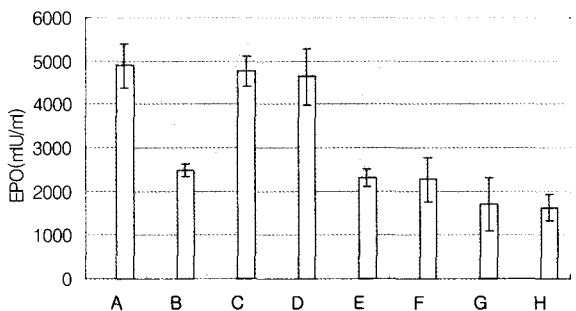
고해서 uptake되는 DNA의 양이 상대적으로 적기 때문이라고 판단된다.



(a)



(b)

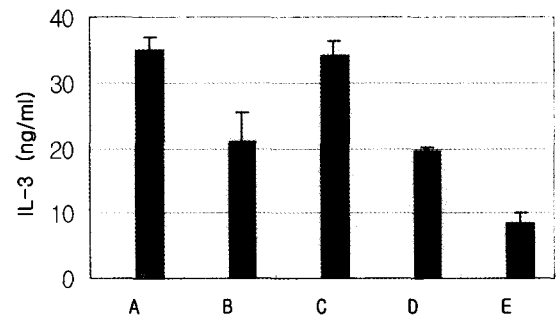


(c)

**Figure 2.** (a) Level of hEPO secretion after transfection into COS-7 cells with plasmid DNAs (b) Level of hEPO secretion after transfection into NIH-3T3 cells with plasmid DNAs (c) Level of hEPO secretion after transfection into COS-7 cells with plasmid DNAs; A:pVAC-hEPO, B:pSectagB-hEPO, C:pVAC-hEPO + pVAC-hIL3, D:pVAC-hEPO + pVAC-hTPO, E:pSectagB-hEPO + pSectagB-hIL3, F:pSectagB-hEPO + pSectagB-hTPO, G:pSectagB-hEPO-hIL3 and H:pSectagB-hEPO-hTPO.

두번째로 pVAC-hEPO에 pVAC-hIL3와 pVAC-hTPO를 각각 혼합하고, pSectagB-hEPO에 pSectagB-hIL3와 pSectagB-hTPO를 각각 혼합한 DNA 용액과 pSectagB-hEPO-hIL3와 pSectagB-hEPO-hTPO를 COS-7에 transfection한 뒤 EPO ELISA를 실시한 결과 위와 동일한 경향을 가지는 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 2(c)). hEPO가 포함된 플라스미드에 다른 플라스미드를 혼합한 경우에도 hEPO의 발현에는 영향을

주지 않는다는 것을 알 수 있었고, pSectagB-hEPO이 포함되는 플라스미드를 transfection하여 얻은 EPO의 양을 100%로 보았을 때 pVAC-hEPO이 포함되는 경우 192~200%만큼 발현하였고, pSectagB-hEPO-hIL3와 pSectagB-hEPO-hTPO의 경우에는 68~70%만큼 발현되었다. 이 결과는 벡터의 크기가 증가함에 따라 transfection의 효율이 감소되는 결과를 다시 확인할 수 있을 뿐 아니라, 두 개 이상의 유전자를 사용하여 시너지 효과를 바라는 경우에 있어서 벡터 두 개를 작게 만들어 혼합 (mixed delivery system)하여 사용하므로 전달 효율을 증가시키는 대신 벡터 제조공정이 추가되는 경우와 한 개의 벡터에 두 개의 유전자를 삽입 (co-delivery system)하여 사용하므로 벡터 제조공정을 줄이는 대신 전달 효율이 감소되는 경우 등 두 가지 경우를 고려할 필요가 있다.



**Figure 3.** IL-3 Level of hIL-3 secretion after transfection into COS-7 cells with plasmid DNAs; A:pVAC-hIL3, B:pSectagB-hIL3, C:pVAC-hEPO + pVAC-hIL3, D:pSectagB-hEPO + pSectagB-hIL3 and E:pSectagB-hEPO-hIL3.

이러한 양상은 *in vitro* transfection에 의한 hIL-3의 발현량의 측정에서도 동일한 결과를 확인하였다(Fig. 3). pVAC-hIL3과 pSectagB-hIL3를 비교하였을 때 hIL-3의 발현량이 pVAC-hIL3의 경우가 167% 많았고, pSectagB-hEPO-hIL3를 transfection하였을 경우에는 pSectagB-hIL3의 40%만큼의 hIL-3를 발현하였다. 그리고 pVAC-hEPO와 pSectagB-hEPO를 혼합하는 경우에도 그것에 상관없이 hIL-3가 발현되었다.

***in vivo* assay**

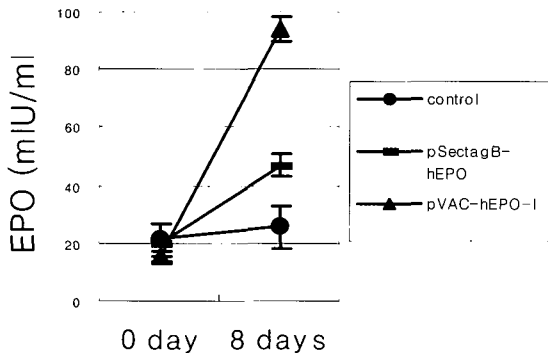
먼저 새로 제작된 pVAC가 기존의 pSectagB에 비해 체내로의 유전자 전달의 성능과 전달된 유전자 즉, hEPO에 의한 적혈구 생산의 증가를 *in vivo* 실험으로 관찰하였다.

pVAC-hEPO와 pSectagB-hEPO 100 µg을 투여 1주전에 cardiotoxin이 선행 투여된 6주령 female BALB/c 각각 3마리의 대퇴상두근 (tribialis anterior)에 근육주사하고 1주 후에 안하정맥총 (orbital venipuncture) 방식으로 채혈하였다. 채혈된 혈액은 모세관에 담아 hematocrit을 측정하였고, serum상의 EPO 발현량을 ELISA를 통해 측정하였다.

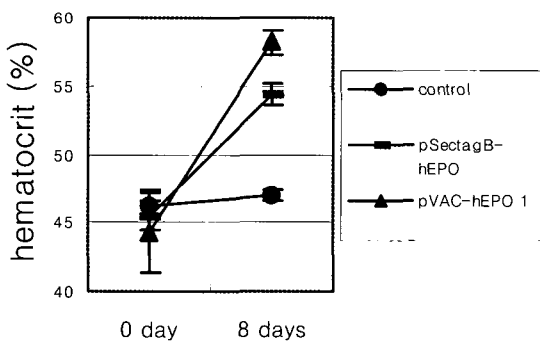
serum상의 hEPO의 양은 plasmid DNA 투여전에 20 mIU/ml을 유지하던 것이 pVAC-hEPO를 투여한 것은 약 90 mIU/ml로, pSectagB-hEPO를 투여한 것은 약 50 mIU/ml로 증가하였으며 투여하지 않은 것은 변동이 없었다. 이러한

결과는 플라스미드 벡터에 유전자를 삽입하여 체내에 전달하여 그 유전자의 단백질을 발현할 수 있고, 위의 *in vitro* transfection의 실험에서와 같이 pVAC의 gene delivery 성능이 pSectagB보다 우수하고 유전자의 발현에 영향을 미친다는 것을 입증한다.

Hematocrit도 pVAC-hEPO가 투여된 것은 44%에서 58%로 32% 증가하였고, pSectagB-hEPO가 투여된 것은 46%에서 54%로 17% 증가하였다(Fig. 4). 이러한 결과로 볼 때 human EPO와 murine EPO의 genome 상의 homology가 80% 정도이므로 전달된 플라스미드 DNA에 의해 발현된 hEPO가 mouse 체내에서 적혈구 생산에 기여했고, pVAC이 pSectagB보다 더 우수한 전달 능력을 가지고 있다는 결론을 내렸다.



(a)



(b)

**Figure 4.** (a) Level of hEPO secretion after intramuscular injection with constructed vectors in Balb/c mice (b) Level of hematocrit after intramuscular injection with constructed vectors in Balb/c mice.

**고 찰**

유전자 전달 시스템에서 플라스미드 DNA를 효과적으로 전달하기 위해 플라스미드 벡터의 소형화와 두 개 유전자의 벡터 내 동시 삽입이라는 두 가지 전략을 가지고 위의 실험을 수행하였다. 사용된 유전자는 체내에서 적혈구 생산에 관여하는 EPO와 IL-3, TPO 등이고, *in vitro*와 *in vivo*의 실험

을 통해 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

첫째, 작은 크기의 플라스미드 벡터를 제조하기 위해 기존의 플라스미드 벡터를 이용하여 2.9 kb의 작은 크기의 pVAC를 제조하였고, pVAC과 기존의 pSectagB에 유전자를 각각 혹은 두 개를 동시에 삽입하여 DNA vaccine용 플라스미드 DNA를 구성하였다.

둘째, *in vitro* transfection 결과 hEPO의 경우 pVAC-hEPO가 pSectagB-hEPO에 비해 2~4배 정도 발현량이 많았고, hIL-3의 경우에는 pVAC-hIL3가 pSectagB-hIL3에 비해 67% 많았다.

셋째, pSectagB-hEPO-hIL3의 경우 *in vitro* 실험결과 두 가지의 유전자가 모두 정상적으로 발현되었으나, hEPO는 pSectagB-hEPO보다 30%, hIL-3는 pSectagB-hIL3보다 60% 감소하였다. 2번의 결과와 함께 보면, 벡터의 크기가 클수록 단백질의 발현량이 감소하였고 따라서 벡터의 크기가 작을수록 transfection 효율이 우수하다는 결론을 내렸다.

넷째, Balb/c mouse에 hEPO가 삽입된 플라스미드 DNA를 주입한 결과 pVAC의 경우가 pSectagB에 비해 serum내 hEPO의 양과 hematocrit의 증가에 효과적이었다. 플라스미드 DNA를 이용하여 유전자 전달을 통해 체내의 단백질 생성을 관찰하였다.

**요 약**

혈청내 단백질 결핍을 효과적으로 치료하기 위해 여러 가지 방법의 유전자 전달 치료가 연구되고 있다. 그 중에서 빈혈 치료제인 에리스로포이에틴 (EPO)은 가장 활발하게 연구되어지는 분야중의 하나이다.

본 연구는 궁극적으로 체내의 적혈구 생산의 증가를 기대하는 기존의 유전자 전달 시스템의 개량을 목표로 한다. 이를 위해 플라스미드 DNA 벡터를 경량화하여 세포로의 침투량의 증가를 기대하고, EPO와 함께 에리트로포이에시스 (적혈구생산)에 기여할 수 있는 인터루킨-3 (IL-3)와 트롬보포이에틴 (TPO)을 이용하는 복합 전달 시스템 (co-delivery system)을 구성하여 시너지 효과에 의한 조절작용의 증가를 기대하였다. 특히 한 개의 벡터에 두 개 이상의 유전자를 삽입하므로 DNA 백신의 산업적인 제조 공정의 감축을 기할 수 있는 장점이 있다.

기존의 벡터를 경량화한 pVAC이라는 벡터를 구성하였는데 이는 pSectagB와 PUC19에서 최소한의 필요한 요소만 조합하여 새롭게 만들어 크기가 2.9 Kb로 기존의 다른 플라스미드 DNA 벡터에 비해 현저히 작은 플라스미드 벡터이다. 복합 전달 시스템을 구성하기 위해 인간 IL-3 유전자와 인간 TPO 유전자를 각각 인간 EPO 유전자와 동시에 삽입하여 구성하였다.

*in vitro* 트랜스펙션 (transfection)을 통해 pVAC의 세포 침투 효율성이 pSectagB보다 우수하고, 쥐에게 주입하여 적혈구용적율 (hematocrit)를 관찰한 결과 pVAC을 이용한 것이 더 기여하는 결과를 얻었다. 그리고 복합 전달 시스템을 구성하는 여러 플라스미드 DNA를 제작하여 *in vitro*에서 유전자의 발현을 관찰하였다.

## REFERENCES

1. Tripathy, S. K., E. C. Svensson, H. B. Black, E. Goldwasser, M. Margalith, P. M. Hobart, and J. M. Leiden (1996), Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 10876-10880.
2. Mennuni, C., F. Calvaruso, I. Zampaglione, G. Rizzuto, D. Rinaudo, E. Dammassa, G. Ciliberto, E. Fattori, and N. La Monica (2002), Hyaluronidase increases electrogene transfer efficiency in skeletal muscle, *Hum. Gene Ther.* **13**, 355-13365.
3. Mir, L. M., M. F. Bureau, J. Gehl, R. Rangara, D. Rouy, J. M. Caillaud, P. Delaere, D. Branellec, B. Schwartz, and D. Scherman (1999), High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 4262-4267.
4. Perrie, Y., P. M. Frederik, and G. Gregoriadis (2001), Liposome-mediated DNA vaccination: the effect of vesicle composition, *Vaccine*. Apr. **30**, 3301-3310.
5. Cheung, J. Y., and B. A. Miller (2001), Molecular mechanisms of erythropoietin signaling, *Nephron*. Mar. **87**:3, 215-222.
6. Maruyama, H., K. Ataka, F. Gejyo, N. Higuchi, Y. Ito, H. Hirahara, I. Imazeki, M. Hirata, F. Ichikawa, T. Neichi, H. Kikuchi, M. Sugawa, and J. Miyazaki (2001), Long-term production of erythropoietin after electroporation-mediated transfer of plasmid DNA into the muscles of normal and uremic rats, *Gene Ther.* Mar. **8**(6), 461-468.
7. Klinman, D. M., J. Conover, J. M. Leiden, A. S. Rosenberg, and J. M. Sechler (1999), Safe and effective regulation of hematocrit by gene gun administration of an erythropoietin-encoding DNA plasmid, *Hum Gene Ther.* Mar. **10**:4 659-665.
8. Martinez, X., C. Brandt, F. Saddallah, C. Tougne, C. Barrios, F. Wild, G. Dougan, P. Lambert, and C. Siegrist (1997), DNA immunization circumvents deficient induction of T helper type 1 and cytotoxic T lymphocyte responses in neonates and during early life, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8726-8731.
9. Guiherne, N., M. Ferreira, Gabriel A. Monteiro, and Joaquim M. S. Cabral (2000), *TIBTECH*. **18**, 380-388.
10. Maruyama, H, K. Ataka, F. Gejyo, N. Higuchi, Y. Ito, H. Hirahara, I. Imazeki, M. Hirata, F. Ichikawa, T. Neichi, H. Kikuchi, M. Sugawa, and J. Miyazaki. (2001), Long-term production of erythropoietin after electroporation-mediated transfer of plasmid DNA into the muscles of normal and uremic rats, *Gene Ther.* **8**(6), 461-468.
11. Luo, D. and W. Mark Saltzman (2000), *Nature Biotech.* **18**, 33-37.
12. Maruyama, H., M. Sugawa, Y. Moriguchi, I. Imazeki, Y. Ishikawa, N. Higuchi, J. Kazama, F. Gejyo, and J. Miyazaki (2000), Continuous Erythropoietin Delivery by Muscle-Targeted Gene Transfer Using *in Vivo* Electroporation, *Hum. Gene Ther.* **11**, 429-437.
13. Mennuni, C., F. Calvaruso, I. Zampaglione, G. Rizzuto, D. Rinaudo, E. Dammassa, G. Ciliberto, E. Fattori, and N. L. Monica (2002), Hyaluronidase Increases Electrogen Transfer Efficiency in Skeletal Muscle, *Hum. Gene Ther.* **13**, 355-365.
14. Nguyen, H. K., P. Lemieux, S. V. Vinogradov, C. L. Gebhart, N. Guerin, G. Paradis, T. K. Bronich, V. Y. Alakhov, and A. V. Kabanov (2000), Evaluation of polyether-polyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents, *Gene Ther.* **7**, 126-138.