

Studies on the Effective Drug Delivery System Using Naked Plasmid DNA for the Erythropoietin Expression *in vivo*

박영섭¹, 정동건², 안진호¹, 최차용^{1,2}, 주현³

서울대학교 협동과정생물화학공학전공¹, 서울대학교 응용화학부²,
아주대학교 생명과학과³

전화 : (02)880-7079 FAX: (02)888-1604

Abstract

There has been interest in developing gene therapy based on naked plasmid DNA for treating serum protein deficiencies and human erythropoietin (hEPO) is one of the candidate for gene therapy being investigated most enthusiastically. We constructed novel plasmid DNA vectors pVAC-hEPOI/II/III which contain one, two, three hEPO gene(s) respectively for producing high level expression and secretion of hEPO *in vitro* and *in vivo*. NIH3T3 and COS7 cells were transfected transiently with these vectors and increase in hEPO expression in medium reached 2-5 fold in comparison with pSecTagB-hEPO. Intra muscular administrations of pVAC-hEPOI/II/II vectors into mice resulted in high level secretion of hEPO in the serum and corresponding increases in hematocrit level. In conclusion, the transduction efficiency of naked plasmid vectors is one of the critical factors of a gene delivery system and these novel plasmid vectors will contribute to various gene therapy based on naked plasmid DNA.

1. 서론

Hemophilia A, diabetes mellitus, erythropoietin(EPO)-responsive anemia 등과 같은 많은 선천성 혹은 후천성 serum protein deficiency 들이 purified or recombinant protein의 반복적인 정맥주사나 피하주사를 통해 치료되고 있다. chronic renal failure 환자에게 자주 나타나는 증세인 악성 빈혈의 경우 recombinant human erythropoietin(rhEPO)의 접종이 효과적인 것으로 나타나 있다. Pharmacokinetic 연구에 따르면 피하주사된 recombinant human erythropoietin이 정맥주사된 것보다 serum EPO 농도는 낮지만 낮은 흡수 속도 때문에 더 오랜기간 체내에 존재하는 것으로 나타났다. 가장 작은 양으로 치료가 가능한 경우는 매일 피하주사를 통해 일정한 양의 recombinant human

erythropoietin를 투여하는 것으로 밝혀졌다. 하지만 이러한 치료는 효과는 좋지만 recombinant human erythropoietin이 워낙 고가이기 때문에 비용이 과다하고 환자 개인이 자가접종을 해야 하는 불편이 있고 관리가 어려운 단점이 존재한다. 이것은 악성 빈혈뿐만 아니라 다른 종류의 serum deficiency 에도 공통적으로 존재하는 문제점이다.

in vivo transfer를 위해 사용되는 vector는 plasmid DNA, replication- defective adenovirus vector와 adeno-associated virus vector가 있다. Protein -encoding plasmid DNA를 gene therapy에 사용하는 가능성은 여러 가지 형태로 검증되었다. 1990년 Wolff와 공동 연구자들이 근육주사된 plasmid DNA가 skeletal myocyte에 침투해서 19개월 동안 발현되는 것을 관찰한 이래로 많은 연구에서 다양한 방법으로 실험이 이루어져왔다.

본 연구에서는 보다 효율적이고 강력한 plasmid DNA vector를 사용하여 *in vivo*와 *in vitro* 상에서 plasmid DNA vector의 세포 침투량을 증가시켜 결과적으로 human EPO(hEPO)의 발현량을 늘릴 수 있는지를 알아보았다. pVAC은 크기가 기존의 다른 plasmid DNA vector에 비해 현저히 작기 때문에 세포 침투 효율이 높을 것으로 예상되었고 또한 plasmid DNA vector 자체에 여러 개의 EPO gene을 삽입한 multiple cassette gene을 가진 vector를 만들어 size로 인한 세포침투 dosage 효과와 세포 내에서의 hEPO 발현량중 어떤 것이 더 중요한 요소인가를 알아보는 실험을 수행하였다. 이와 함께 plasmid DNA vector로 사용되고 있는 pSectag B에 hEPO gene을 삽입하여 pVAC으로부터 만들어진 각 vector와 비교하는 실험을 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 pVAC-hEPO I/II/III 의 제조

PCR을 통해 5'에 Hind III 인식부위를, 3'에 Xba I 인식부위가 포함된 hEPO를 제조하였고. 플라스미드 pVAC을 restriction enzyme Hind III/Xba I 처리한 후 PCR product와 ligation 반응을 통해 pVAC-hEPO I 을 제조하였다. 그 이후에 pVAC-hEPO I 을 Bgl II로 single cut한 것과 BamH I 과 Bgl II로 double cut한 두 fragment중 hEPO가 포함된 것을 ligation하여 pVAC-hEPO II를 제조하였다. 마지막으로, pVAC-hEPO II를 Bgl II로 single cut한 것과 BamH I 과 Bgl II로 double cut한 두 fragment중 hEPO가 포함된 것을 ligation하여 6.8Kb 크기의 pVAC-hEPOIII를 제조하였다. 클로닝한 모든 플라스미드 벡터는 적절한 제한효소로 반응하여 확인하였으며 시퀀싱을 거쳐 올바른 유전자가 클로닝 되었음을 확인할 수 있었다.

2.2 *in vitro* assay

DNA 농도가 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 인 pVAC, pVAC-hEPO I / II / III와 pSectagB-hEPO $2\mu\text{g}$ 을 Quagen

effectene transfection kit를 이용해 COS7과 NIH 3T3에 transfection하고 24시간 후에 EPO 발현량을 Roshe human EPO ELISA kit를 이용해 측정하였다.

2.3 *in vivo* assay

PBS에 녹인 농도가 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 인 pVAC, pVAC-hEPO I/II/III와 pSectagB-hEPO $50\mu\text{g}$ 을 5주령 female BALB/c의 tribialis anterior에 근육주사하고 1/3/5/7주 후에 orbital venipuncture을 통해 채혈하였다. 채혈된 혈액은 모세관에 담아 hematocrit을 측정하였고, serum상의 EPO 발현량을 ELISA를 통해 측정하였다.

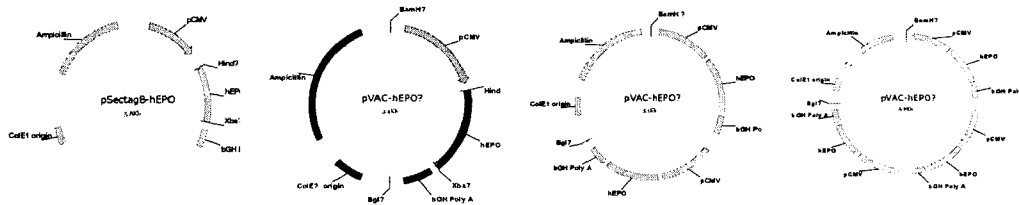


Fig. 1. Schematic illustration of pSectag B-hEPO, pVAC-hEPO-I, pVAC-hEPO-II and pVAC-hEPO-III.

3. 결과 및 고찰

In vitro 실험 결과, pVAC-hEPO I의 EPO 발현량이 pSectagB-hEPO보다 COS 7에서는 약 2배, NIH 3T3이 경우 약 4배까지 높은 것을 알 수 있었다. 또한 pVAC-hEPO II의 발현량도 pVAC-hEPO I의 발현량보다는 작지만 pSectagB-hEPO보다 COS 7에서는 1.5배, NIH 3T3에서는 약 3배까지 높았다. 이에 반해 pVAC-hEPO III의 발현량은 다른 vector 들에 비해 현저히 낮게 나타났다. pVAC을 넣은 animal cell과 어떤 DNA도 넣지 않은 control은 EPO가 거의 나타나지 않았다. (Fig. 2.)

이러한 결과로 볼 때 plasmid vector의 크기 차이로 인한 transfection dosage가 naked plasmid DNA를 이용한 drug delivery에서 가장 중요한 요소임을 알 수 있었다. pSectagB-hEPO에 비해 유사한 크기의 pVAC-hEPO II가 발현량이 현저히 높은 것은 transfection 후 nucleus상에서 double EPO gene의 발현으로 인한 발현량 증가 때문으로 보이며 mutiple gene cassette이 발현량에 영향을 미치는 한 요소인 것으로 판단된다.

In vivo 실험 결과 pVAC-hEPO I을 주사한 mouse의 hematocrit이 다른 DNA를 주사한 mouse에 비해 더 많이 상승하였다. 하지만 3주 이후에는 hematocrit이 DNA를 주사하

지 않은 control에 비해 거의 상승하지 않았다. (Fig. 3.)

이것은 human EPO와 murine EPO는 homology가 거의 일치하기 때문에 처음에는 BALB/c 내에서 hEPO가 mEPO와 동일한 기작으로 작용을 하여 적혈구의 생성량이 일시적으로 증가하지만 시간이 조금 흐른 뒤에는 mouse 내에서 hEPO를 제거하는 antibody가 만들어져 hEPO가 거의 작용을 하지 못하는 것으로 보인다. serum에 대한 EPO ELISA 결과 원래 혈액 속에 존재하는 소량의 EPO 외에는 검출할 수가 없었다.

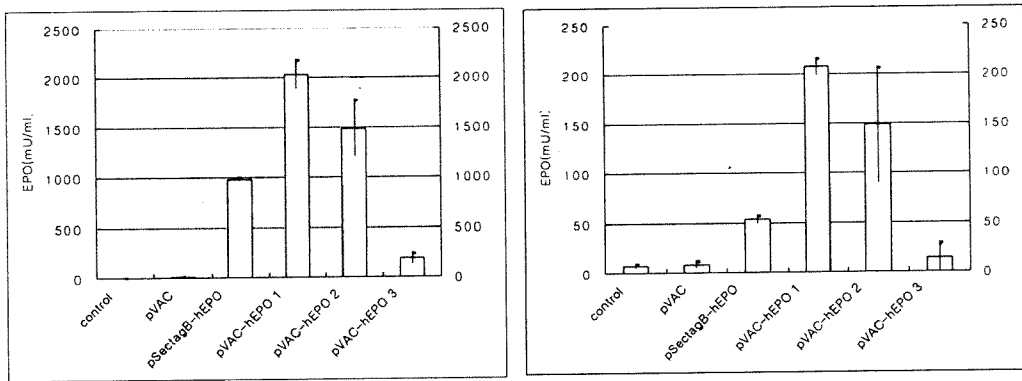


Fig. 2. hEPO secretion after transfection of NIH3T3 and COS7 cells

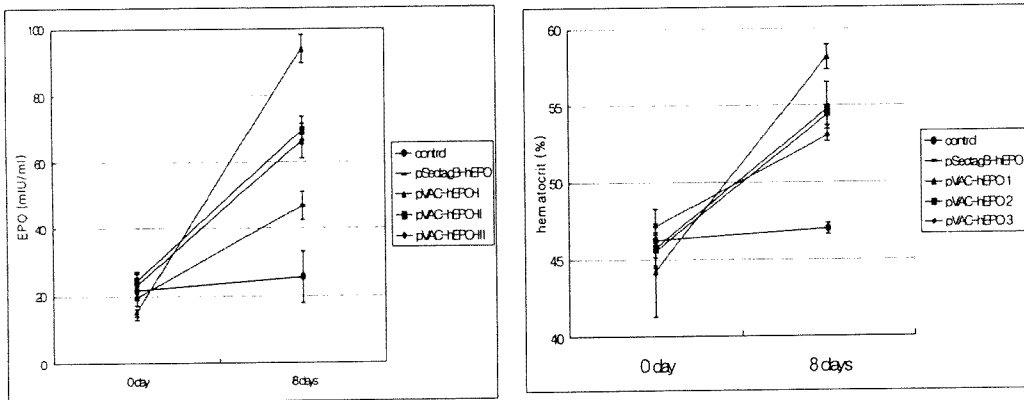


Fig. 3. Serum hEPO and hematocrit levels after intramuscular injection with constructed vectors in Balb/c mice.

참고문헌

1. Tripathy SK, Svensson EC, Black HB, Goldwasser E, Margalith M, Hobart PM, Leiden

- JM, 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 (1996) 10876-80.
2. Mennuni C, Calvaruso F, Zampaglione I, Rizzuto G, Rinaudo D, Dammassa E, Ciliberto G, Fattori E, La Monica N, Hyaluronidase increases electroporation efficiency in skeletal muscle, *Hum. Gene Ther.* 13 (2002) 355-65.
 3. Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D, High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (1999) 4262-7.
 4. Perrie Y, Frederik PM, Gregoriadis G, Liposome-mediated DNA vaccination: the effect of vesicle composition, *Vaccine.* Apr 30 (2001) 3301-10.
 5. Cheung JY, Miller BA, Molecular mechanisms of erythropoietin signaling, *Nephron.* Mar 87:3 (2001) 215-22.
 6. Maruyama H, Ataka K, Gejyo F, Higuchi N, Ito Y, Hirahara H, Imazeki I, Hirata M, Ichikawa F, Neichi T, Kikuchi H, Sugawa M, Miyazaki J, 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 (2001) 461-8.
 7. Klinman DM, Conover J, Leiden JM, Rosenberg AS, Sechler JM, Safe and effective regulation of hematocrit by gene gun administration of an erythropoietin-encoding DNA plasmid, *Hum Gene Ther.* Mar 10:4 (1999) 659-65.
 8. Koepke JA, *Practical Laboratory Hematology*, Churchill Livingstone, New York, 1991. pp.112
 9. Davis HL, Demeneix BA, Quantin B, Coulombe J, Whalen RG, Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle, *Hum Gene Ther.* Dec 4:6 (1993) 733-40.
 10. Grossmann A, Lenox J, Ren HP, Humes JM, Forstrom JW, Kaushansky K, Sprugel KH, Thrombopoietin accelerates platelet, red blood cell, and neutrophil recovery in myelosuppressed mice, *Exp Hematol.* Aug 24:10 (1996) 1238-46.
 11. Kobayashi M, Laver JH, Kato T, Miyazaki H, Ogawa M, Recombinant human thrombopoietin (Mpl ligand) enhances proliferation of erythroid progenitors, *Blood.* Oct 86:7 (1995) 2494-9.