

Vascular Endothelial Growth Factor 165(VEGF₁₆₅) 발현 벡터(pCK-VEGF)의 랫드와 마우스에서의 급성독성

이영주^{1,2} · 조홍찬¹ · 박은진² · 안병옥³ · 김덕경⁴ · 김선영^{1*}
¹서울대학교 유전공학연구소, ²(주)바이로메드, ³동아제약(주)연구소
⁴성균관대학교 의과대학, 삼성서울병원 순환기내과

Acute Toxicity of pCK-VEGF in Rats and Mice

Young Joo Lee^{1,2}, Hong Chan Cho¹, Eun Jin Park², Byung Ok Ahn³,
Duk-Kyung Kim⁴ and Sun Young Kim¹

¹Institute for Molecular Biology and Genetics, Seoul National University, Seoul, Korea

²ViroMed Limited, Seoul, Korea

³Research Laboratories Dong-A Pharm. Co. Ltd., Seoul, Korea

⁴SungKyunKwan University School of Medicine, Samsung Medical Center, Seoul, Korea

(Received December 5, 1999)

(Accepted February 18, 2000)

ABSTRACT : It has been demonstrated that the injection of naked DNA expressing vascular endothelial growth factor 165 (VEGF₁₆₅) to the affected area can provide significant therapeutic effects on peripheral artery occlusive diseases. Success with this type of gene therapy highly depends on the quality of the vector delivering the therapeutic gene, especially in terms of the level and duration of gene expression in the localized area. We have recently developed a vector expressing VEGF₁₆₅ (pCK-VEGF) for the treatment of peripheral artery occlusive diseases and demonstrated high level expression of VEGF₁₆₅ in mouse skeletal muscle. This study was designed to assess the acute toxicity of intramuscularly injected pCK-VEGF in BALB/c mice and Sprague-Dawley rats. There was no evidence of any changes in clinical signs, body weights, or gross pathological signs. We estimate LD₅₀ values of pCK-VEGF higher than 50 mg/kg in mice and 20 mg/kg in rats by intramuscular injection.

Key Words : Ischemic disease, Naked DNA gene therapy, VEGF, Acute toxicity

I. 서 론

혈관작용투과성 인자라고도 알려진 vascular endothelial growth factor(VEGF)는 내피조직을 특이적으로 활성화시키는 분비형의 당단백질로서, 일반적인 혈관형성에 관여한다(Ferra 등, 1992). VEGF 유전자의 전사체는 스플라이싱에 의해 각각 121, 165, 189, 206개의 아미노산으로 이루어진 4가지 동종체(isoform)인 VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆이 만들어진다(Ferra 등, 1992). 이중 VEGF₁₆₅를 naked DNA 형태로 투여하여 혈관생성을 촉진시켜 측부혈관을 형성시킴으로써 허혈성 말초동맥질환 치료에 사용하고 있다. Isner팀은 VEGF₁₆₅ 발현벡터를 2 mg씩 월 1회,

2번 투여한 결과 9명의 환자중 8명의 환자에서 치료효과가 있었다고 임상시험 1상의 결과를 발표하였다(Baumgartner 등, 1998). 특히 이중 2명의 환자는 족부절단술을 권유받았으나 유전자치료후 수술이 불필요하게되는 뛰어난 치료효과가 관찰되었다(Baumgartner 등, 1998). 본 연구에서는 Isner팀이 사용한 유전자 발현벡터보다 발현율과 경제성이 뛰어난 VEGF₁₆₅ 발현벡터인 pCK-VEGF를 자체개발하여 임상에 적용하기위한 안전성 실험의 일환으로 급성독성시험을 실시하였다.

플라스미드 DNA는 임상에서 암등의 불치병에서부터 백신에 이르기까지 광범위하게 적용되고 있다. 플라스미드 DNA는 플라스미드 자체의 독성, 발현된 단백질에 의한 독성, 자가면역반응 유발, 숙주세포로의 플라스미드 DNA 삽입등의 독성을 유발할 수 있다. 하지만, 이제까지 이러

*To whom correspondence should be addressed

한 위험이 실제 관찰된 보고는 없다(Nabel 등, 1992; Stewart 등, 1992; San 등, 1992; Canonico 등, 1994; Parker 등, 1995; Parker 등, 1999). 특히 근육주사한 DNA는 체내의 다른 장기로 침투하지 못하며, 주사부위에서만 발현된다(Nichols 등, 1995; Wineger 등, 1996). 플라스미드 DNA를 근육에 반복투여하여 독성을 조사한 결과, 주사부위인 근육에서도 어떠한 이상도 관찰되지 않았음이 보고되어 있다(Parker 등, 1999). 본 연구진들도 근육주사한 pCK-VEGF가 근육에만 국한되어 발현되며, 간, 비장, 고환, 폐, 심장등의 장기에서 조직학적 검사결과를 보고한 바 있다(이 등, 1999).

본 연구에서는 naked DNA 형태의 pCK-VEGF를 임상 예상용량의 1500~3000배까지 근육 주사하여 급성독성 시험을 실시하여 임상증상의 이상 유무를 조사하였다. 이제까지의 수십건의 연구결과와 마찬가지로 naked DNA의 주사에 의한 이상은 관찰되지 않았다. 또한 현재 미국에서 임상시험 제2상 실시중인 제조한 VEGF에 의한 독성도 보고된 바 없어 pCK-VEGF는 임상용량내에서는 안전한 물질일 것으로 판단된다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

시험동물에 주사한 플라스미드는 pCK-VEGF로서 참고 문헌에 상세히 서술되어 있다(이 등, 1999). VEGF₁₆₅ cDNA는 165개의 아미노산으로 구성된 VEGF로서(Tischer 등, 1991), 사람의 vascular smooth muscle cell에서 분리한 total RNA를 이용 RT-PCR 방법으로 클로닝한 후 염기서열을 확인하고 pCK 벡터에 삽입하여 pCK-VEGF 플라스미드를 제조하였다(이 등, 1999). Clontech Giga Column(Clontech)을 이용하여 분리한 DNA를 1~5 mg/ml의 농도로 Phosphate-buffered saline(PBS)에 용해하였다. 내독소의 제거는 Pharmacia의 Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel을 사용하여 제거하였다. 시험물질의 내독소는 E-Toxate Assay kit(Sigma)를 이용하여 검정한 결과 0.60 EU/mg 이하였다.

2. 시험 동물 및 사육 환경

시험 동물은 서울대학교 약학대학 동물실험연구동내 항온 항습 조절장치가 부착된 사육실에서 사육하였으며, 사육 온도는 20±2°C, 습도는 50±6%, 환기속도 11~13회/시간, 명암 조절은 12시간, 조도는 300~500 lux의 조건을 유지시켰다. 시험 동물은 청정구역에서 생산된 특정 병원체 부재 4주령 자웅 BALB/C 마우스와 4주령 Sprague-

Dawley 랫드를 (주)대한실험동물에서 분양받았다. 마우스는 실험 동물용 폴리카보네이트 사육상자(220 W×270 L×125 mm)에 넣었고 랫드는 폴리카보네이트 사육상자(260 W×420 L×180 mm)에 넣어 사육하였고 1주일 이내의 순화기간을 거쳐 실험을 하였다. 사료는 중앙실험동물센터의 실험 동물 사료를 구입, 멸균하여 자유로이 공급하였으며, 음수는 멸균한 수돗물을 자유롭게 섭취시켰다.

3. 시험군 및 투여방법

마우스에서는 임상예상용량(16.6~33.33 µg/kg)의 약 1500~3000배인 50~mg/kg을 투여최고용량으로하여 공비 0.5로하여 5개의 용량군을 설정하였으며, 근육주사액은 모두 동일하게 200 µl로 하였다. 랫드에서는 20 mg/kg을 투여최고용량으로 하여 공비 0.5로 하여 5개의 용량군을 설정하였으며, 근육주사량은 모두 동일하게 500 µl로 하였다. 실험동물은 순화기간중에 건강하다고 판단된 동물의 체중을 측정하여 평균체중에 가까운 개체들이 골고루 들어가도록 무작위법으로 군당 5마리를 사용하여 군분리를 하였다. 근육주사는 마우스와 랫드의 전경골근에 인슐린 주사기를 사용하였으며 대조군에는 DNA를 용해하지 않은 PBS를 동량 주사하였다.

4. 관찰 및 검사항목

1) 임상증상 및 사망관찰

투여당일은 투여후 6시간까지 1시간마다 일반상태를 관찰하였고, 투여 다음날부터 7일까지는 매일 1회씩 일반상태의 변화, 중독증상 및 폐사동물의 유무를 관찰하였다. 예비실험을 21일까지 하였을 때 특별한 이상을 관찰할 수 없어 가역성 독성변화의 유무를 관찰하기 위해 시험기간은 1주일로 하였다.

2) 체중변화

모든 동물에 대하여 투여 직전 및 투여 후 1, 3, 7일째에 실시하였다.

3) 부검

시험 종료 후 방혈치사시켜 내부장기의 육안적 이상유무를 상세히 관찰하였다.

5. 통계학적 방법

체중의 변화는 동일 시점에 대한 대조군과 투여군과의 차이를 Sigmastat의 One-way ANOVA와 Bonferroni's t-test를 사용하여 분석하였고 p<0.05일 경우 유의한 차이로

인정하였다.

III. 결 과

1. LD₅₀와 폐사율

시험 전기간을 통하여 마우스와 랫드의 암수 모두에서 근육주사시 폐사동물은 관찰되지 않았다. 따라서 pCK-VEGF의 LD₅₀ 값은 근육주사시 마우스에서는 50 mg/kg 이상, 랫드에서는 20 mg/kg 이상인 것으로 판단되었다.

2. 임상증상

시험 전기간을 통하여 마우스 암수와 랫드 암수 모두에서 pCK-VEGF에 의한 어떠한 임상증상도 관찰되지 않았다. 체중의 변화는 투여군과 대조군 사이에 유의성있는 변화가 있는 군이 관찰되었으나 용량 상관성이 없어 투여용량군 사이에 유의성있는 개체 차이는 없는 것으로 판단된

다(Tables 1, 2).

3. 해부병리 소견

시험종료 후 부검하여 육안적 해부 소견 및 임상증상을 관찰하였다. 모든 시험 동물에서 대조군에 비해 간, 비장, 신장, 폐, 심장등에 특이할 만한 해부 소견이 관찰되지 않았다.

V. 고찰 및 결론

말초 동맥 질환은 보행시 하지 동맥의 협착 또는 폐색으로 인하여 다리에 허혈증상을 일으키는 질환이다. 이 질환은 최근까지 효과적인 약물 치료법이 없었던 바, 이러한 한계성을 극복하기 위하여 측부혈관의 형성을 증진시킬 수 있는 VEGF유전자를 직접 하지근육에 투여하여 치료하려는 유전자치료가 시도되었다(Isner 등, 1997). 이러한 방법은 미국의 Isner팀에 의해 제1상 임상시험이 완료

Table 1. Body weights of male and female BALB/C mice injected with pCK-VEGF

sex	Days after treatment	Dose (mg/kg)					
		0	3.125	6.25	12.5	25	50
Male	0	17.6±0.48	18.2±0.72	17.2±1.04	19.2±0.64	19±1	17.2±1.44
	1	18.8±0.84	20±0.71	18±1.58	20.2±0.45	20.2±1.48	18.2±1.3
	3	20.2±1.1	21.2±1.1	20±1.41	21.8±1.3	22.2±1.3	20.2±1.1
	5	20.6±1.34	22.2±1.1	21.2±1.3	22.6±1.3*	21.6±1.82	21.2±0.45
	7	21.6±1.36	24±1.2*	22.2±1.44	23.6±1.52	23.6±0.72	21.8±0.32
Female	0	16±0.4	15.8±0.64	16.6±0.48	16.6±1.12	15.4±0.88	16.6±1.28
	1	20.2±1.1	21.2±1.1	20±1.41	21.8±1.3	22.2±1.3	20.2±1.1
	3	19±0.71	18.8±1.3	19.8±0.45	19.2±1.1	19.4±0.89	18.8±0.84
	5	19.2±1.1	18.2±1.1	18.2±1.1	19.6±1.52	19.6±0.55	19.2±0.45
	7	20±0.8	17.6±1.28	18.6±0.48	18.8±1.04	19.8±0.72	20.2±1.04

Data are expressed as mean±SD(g).

*significant at P<0.05.No. of animals examined: 5.

Table 2. Body weights of male and female Sprague-Dawley rats injected with pCK-VEGF

sex	Days after treatment	Dose (mg/kg)					
		0	1.25	2.5	5	10	20
Male	0	78.2±11.12	83±2.74	82±2.74	87±2.74	84±4.18	86±5.48
	1	79±4.18	82±5.70	80±3.54	93±5.70*	83±2.74	85±4.47*
	3	97±2.74	98±7.58	98±2.74	112±2.74*	108±2.74*	109±4.18*
	5	78±6.71	78±4.47	87±4.47*	88±2.74*	88±5.70†	79±4.18*
	7	129±4.18	135±8.66	135±9.35	149±4.18*	146±6.52	147±8.37*
Female	0	80±5.00	78±4.47	81±4.18	82±2.74	83±2.74	79±4.18
	1	78±6.71	78±4.47	87±4.47*	88±2.74*	88±5.70*	79±4.18
	3	96±6.52	92±2.74	104±4.18*	106±4.18*	105±3.54*	98±4.47
	5	110±3.16	108±2.45	117±6.00†	121±3.74*	117±4.00*	109±3.74
	7	121±7.42	120±3.54	131±5.48*	133±4.47*	129±2.24*	125±3.54

Data are expressed as mean±SD (g). significant at P<0.05.No. of animals examined: 5

되어 안전성이 입증되었으며, 제1상 임상시험이 종료된 지 2년반 이상이 되었으나 VEGF 유전자 투여(33 µg/kg)에 의한 어떠한 부작용도 보고된 바 없다(Baumgartner 등, 1998). VEGF 발현벡터 외의 다른 유전자를 사용한 약 20 여건의 naked DNA 유전자치료 임상시험과 전임상시험에서도 위험성이 아직 보고된 바 없어 naked DNA가 현재까지 가장 안전한 유전자전달체라고 알려져있다(Department of Health and Human Services, 1998).

본 연구진들은 naked DNA 유전자치료 성공의 최대관건인 유전자발현율을 향상시킨 벡터를 개발하였으며 이 벡터는 기존의 벡터보다 *in vitro*에서 발현량이 30~100배 우수한 것으로 밝혀졌다(이 등, 1998). 본 연구에서는 이와 같이 개발된 VEGF 발현벡터를 유전자치료제로 개발하기 위한 안전성평가의 일환으로 급성독성실험을 수행하였다. pCK-VEGF를 BALB/C 마우스에서 50 mg/kg, 랫드에서 20 mg/kg까지 근육에 주사한 결과 모든 동물에서 임상증상과 해부병리 소견에서 시험물질의 투여에 의한 것이라고 생각되는 변화는 발견되지 않았다. 체중의 변화는 투여군과 대조군사이에 유의성있는 변화가 있는 군이 관찰되었다. 하지만 용량 상관성이 없어 투여용량군사이에 유의성있는 개체 차이는 없는 것으로 판단하였다. 특이하게 응성의 랫드에서 7일째에 현저한 체중증가를 관찰하였으며 이는 5일째에 감소한 체중이 정상으로 돌아온 것으로 판단된다. 이러한 현상은 마우스와 자성의 랫드에서는 관찰되지 않았으며, 실험기간 중의 일시적인 현상으로 사료된다. 결론적으로 시험물질인 pCK-VEGF는 BALB/C 마우스에서의 최소치사량값은 근육주사시 50 mg/kg, 랫드에서는 20 mg/kg 이상으로 이는 임상용량(16.6~33.33 µg/kg)의 1500~3000배에 해당되어 충분히 높은 용량까지 안전할 것으로 기대된다. 임상예상용량 33.33 µg/kg의 pCK-VEGF 투여시 예상되는 환자의 혈장내 VEGF 농도는 보고된 VEGF의 pharmacokinetics 자료에 의해 산출하면 0.65 ng/ml로 예상하고 있다(Baumgartner 등, 1998). 이는 임상1상에서 안전성이 입증된 재조합 VEGF 단백질의 혈장농도인 1.2 ng/ml 보다 2배 정도 낮은 수치로 33.33 µg/kg 용량의 pCK-VEGF는 인체에 안전한 용량일 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부(HMP-99-B-02-0001)와 주식회사 바이로메드의 지원아래 수행되었다.

참고문헌

Baumgartner, I., Piczek, A., Manor, O., Blair, R., Kearney,

- M., Walsh, K. and Isner, J.M. (1998): Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia, *Circulation*, **97**, 1114-23.
- Canonico, A.E., Plitman, J.D., Conary, J.T., Meyrick, B.O. and Brigham, K. (1994): No lung toxicity after repeated aerosol or intravenous delivery of plasmid-cationic liposome complexes, *J. Appl. Physiol.*, **77**, 415-419.
- Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, Recombinant DNA Advisory Committee (1998): *Minutes of Meeting*, June 18-19.
- Ferra, N., Houck, K., Jakeman, L. and Leung, D. (1992): Molecular and Biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins, *Endocrine Reviews*, **13**, 18-32.
- Isner, J.M., Walsh, K., Symes, J., Picezek, A., Takeshita, S., Lowry, J., Rosenfield, K., Weir, L., Brogi, E. and Juragi, D. (1997): Arterial gene transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease, *Hum. Gene Ther.*, **7**, 959-88.
- Nabel, E.G., Gordon, D., Yang, Z.Y., Xu, L., San, H., Plautz, G.E., Wu, B.Y., Gao, X., Huang, L. and Nabel, G.J. (1992): Gene transfer *in vivo* with DNA-liposome complexes: lack of autoimmunity and gonadal localization, *Hum. Gene Ther.*, **3**, 649-656.
- Nichols, W.W., Ledwith, B.J., Manam, S.V. and Troilo, P.J. (1995): Potential DNA vaccine integration into host cell genome, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **772**, 30-39.
- Parker, S.E., Vahlsing, H.L., Serfilippi, L.M., Franklin, C.L., Doh, S.G., Gromkowski, S.H., Lew, D., Manthorpe, C.M. and Norman, J. (1995): Cancer gene therapy using plasmid DNA: Safety evaluation in rodents and non-human primates. *Hum. Gene Ther.*, **6**, 575-590.
- Parker, S.E., Borellini, F., Wenk, M.L., Hobart, P., Hoffman, S.L., Hedstrom, R., Lee T. and Norman, J.A. (1999): Plasmid DNA Malaria Vaccine: Tissue Distribution and safety studies in mice and rabbits, *Hum. Gene Ther.*, **10**, 741-758.
- San, H., Yang, Z.Y., Pompili, V.J., Jaffe, M.L., Plautz, G.E., Felgner, J.H., Wheeler, C.J., Felgner, P.L., Gao, X., Huang, L., Gordon, D., Nabel, G.J. and Nabel, E.G. (1993): Safety and short-term toxicity of a novel cationic lipid formulation for human gene therapy, *Hum. Gene Ther.*, **4**, 781-788.
- Stewart, M.J., Plautz, G.E., Del Buono, L., Yang, Y., Xu, L., Gao, X., Huang, L., Nabel, E.G. and Nabel, J. (1992): Gene transfer *in vivo* with DNA-liposome complexes: Safety and acute toxicity in mice. *Hum. Gene Ther.*, **3**, 267-275.
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowics, D., Fiddes, J. and Abraham, J. (1991): The

human gene for vascular endothelial growth factor-multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing, *J. Biol. Chem.*, **266**, 11947-11954.

이영주, 유승신, 김종목, 나영순, 고규영, 김덕경, 김선영 (1998): 이종유전자유래의 유전자 발현 조절요소를 포함하는

강력한 전사활성을 가진 진핵 세포발현 벡터, 대한 민국 특허 출원 제98-63711호.

이영주, 박은진, 조홍찬, 서연림, 김덕경, 김선영 (1999): Naked DNA를 이용한 말초동맥폐색질환 치료용 VEGF 발현벡터의 안전성 실험, *J. Toxicol. Pub. Health*, **15**, 373-378.