

## 마우스에서 VEGF 발현 Naked DNA 벡터인 pCK-VEGF의 약동력학 및 조직내 분포

도현미 · 고준일 · 이종진 · 손미원 · 조홍찬\* · 김종묵\* · 김병문 · 김선영#

동아제약 (주) 연구소, \*(주) 바이로메드, #서울대학교 생명과학부

(Received October 31, 2000; Revised December 8, 2000)

## Pharmacokinetics and Biodistribution in Mice of pCK-VEGF Expressing Human Vascular Endothelial Growth Factor

Hyounmie Doh, Jun-IL Ko, Jong-Jin Lee, Miwon Son, Hongchan Cho\*,  
Jong-Mook Kim\*, Byong-Moon Kim and Sunyoung Kim#

Research Laboratories of Dong-A Pharmaceutical Co., Ltd,

\*ViroMed Limited

#School of Biological Sciences, Seoul National University

**Abstract** — We recently developed a high efficiency expression vector, pCK, which drives a high level of gene expression in the skeletal muscles of mice. In this study, we investigated the pharmacokinetics and biodistribution of pCK-VEGF expressing human VEGF165 after intravenous or intramuscular administration. The quantity of pCK-VEGF in the tissues of mice was measured by the PCR method which has a detection limit of approximately 1 pg of the exogenously added plasmid. In the case of intravenous administration, the half life of the pCK-VEGF plasmid in the bloodstream was 1.68 min. After intra-muscular administration, the half life of pCK-VEGF plasmid in the bloodstream was 6.78 min. At 90 min post-administration, 30% of the injected pCK-VEGF was found at the site of injection, where it persisted for up to 8 hours. Less than 1.6% of the injected pCK-VEGF plasmid DNA was detected in highly vascularized tissues such as the lung, kidney, and liver at 90 min post-administration, but the plasmid was undetectable at later time points. These results suggested that intramuscularly administered pCK-VEGF persisted for longer periods of time in muscles than in other tissues and that direct intra-muscular injection of pCK-VEGF might be useful for local therapeutic angiogenesis.

**Keywords** □ pCK-VEGF, pharmacokinetics, biodistribution

말초 동맥 질환(peripheral artery disease) 즉, 허혈성 지체질환(limb ischemia)은 하지 동맥의 협착 또는 폐색으로 인하여 다리에 허혈 증상을 일으키는 질환으로 혈관 협착 정도에 따라, 걸으면 다리에 쥐가 나는 듯한 통증이 발생하는 파행(claudication) 증상부터 휴식기의 통증, 심하면 족부에 궤양(ulceration), 괴저(gangrene)를 동반하여 다리를 절단해야 하는 경우까지 다양한 임상 양상을 보인다.<sup>1)</sup> 현재 허혈성 지체

질환 환자에게 여러 가지 내과적인 치료 방법들이 시도되고 있으나 아직 효과적인 치료법이 없는 상태로, 증상이 심한 만성적 허혈 증상을 갖는 환자들에게 경피적 혈관 확장술(percutaneous transluminal angioplasty; PTA) 이나 혈관 우회(bypass) 수술이 시행되고 있으나, 여러 차례 PTA나 우회술을 시행하였거나, 혈관이 너무 작거나, 다른 동반 질환으로 인하여 더 이상의 수술이 불가능한 경우가 많다.<sup>2)</sup> 따라서, 허혈성 지체 질환에 대한 새로운 치료전략이 요구되고 있는 실정이다.

최근 들어, 혈관생성의 세포분자학적 기전이 밝혀짐

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 82-2-880-7529 (팩스) 82-2-875-0907

에 따라 혈관 생성인자들을 단백질이나 유전자 형태로 서 허혈부위에 투여하여 새로운 혈관 즉, 측부혈관을 생성시켜 허혈성 지체질환을 치료하고자 하는 신혈관 조성 치료법이 제시되고 있다.<sup>3)</sup> 특히, 혈관 내피세포에 특이적으로 작용하는 내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF)를 이용한 신혈관 조성 치료법이 안전성 및 유효성면에서 가장 우수한 것으로 나타나 임상연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>4)</sup> 지금까지의 연구결과에서, VEGF의 4개의 이형체(isoform)중 활성이 가장 우수한 것은 VEGF165로 알려져 있고,<sup>5)</sup> 유전자 형태의 치료제가 단백질 형태의 치료제에 비해 안전성과 생물학적 활성이 우수하며, 토끼를 이용한 동물실험과 허혈성 지체질환 환자 9명을 대상으로 한 1상 임상시험에서 안전성과 탁월한 치료 효과가 보고되고 있다.<sup>6,7)</sup>

본 연구팀과 (주) 바이로메드는 사람의 혈관 평활근 세포(vascular smooth muscle cells)로부터 VEGF165 cDNA를 합성하고 고발현 운반체인 pCK에 클로닝하여 pCK-VEGF plasmid DNA 유전자 치료제를 개발하고,<sup>8)</sup> 동물모델에서 높은 유전자 발현 효율을 나타내는 것을 확인하였다.<sup>9)</sup>

본 연구에서는 pCK-VEGF에 대한 마우스의 약동력학 연구를 수행함에 있어, 생체시료 중 pCK-VEGF 정량법을 개발하고자 하였으며, 이를 통하여, 정맥주사 및 근육주사에 의한 약동력학적 반감기와 조직내 분포를 평가하고자 하였다.

## 실험 재료 및 방법

### pCK-VEGF의 제조

VEGF 유전자를 함유하고 있는 plasmid DNA인 pCK-VEGF(4261 bp)는 앞서 보고된 바와 같이 (주)바이로메드에서 제조하였다.<sup>8,9)</sup>

동아제약(주) 연구소 생물약팀은 (주)바이로메드로부터 pCK-VEGF를 제공받아 CaCl<sub>2</sub> 방법을 이용하여 *E. coli* DH5 $\alpha$  균주에 형질도입시킨 후, pCK-VEGF plasmid를 보유하고 있는 균주를 선별하여 생산 세포주은행을 만들었다.<sup>10)</sup> pCK-VEGF는 생산 세포주은행에서 균주 한 바이알을 선택하여 카나마이신 함유 LB 배지에서 종균 배양한 후 15 리터 대량 발효를 하여 제조하였다. 배양액에서 세포를 원심분리로 분리한 후 염기성 분해와 음이온 교환수지 크로마토그래피

(Ultrapure 100; Qiagen, Germany)를 이용하여 plasmid DNA를 최종 정제하였다.<sup>11)</sup>

### pCK-VEGF의 정맥투여 및 혈액분리

6주령의 웅성 ICR 마우스(30~35 g)의 꼬리 정맥에, pCK-VEGF 100  $\mu$ g/head의 용량으로 멸균생리 식염수에 용해시켜 정맥주사하였다. 투여 후 1분, 5분, 15분, 30분, 45분, 60분, 90분, 2시간 및 8시간에 안와정맥총으로부터 혈액을 채취하여 적당량의 EDTA를 첨가하여 잘 혼합한 후, 즉시 액체 질소에 담가 동결시킨 후 분석 전까지 -75°C 냉동고에 보관하였다.

### pCK-VEGF의 근육투여와 혈액 및 조직의 분리

6주령의 웅성 ICR 마우스(30~35 g)의 왼쪽 대퇴부에 pCK-VEGF 100  $\mu$ g/head 용량(3 mg/kg 임상용량의 90배)으로 멸균 생리식염수에 용해시켜 근육주사하였다. 투여 후 5분, 15분, 30분, 90분, 2시간, 8시간, 3일, 30일에 혈액과 각 조직들을 분리하였다. 투여 부위인 근육을 비롯하여 뇌, 심장, 위, 간, 폐, 비장, 소장, 대장, 신장, 고환 등의 장기는 채취하는 즉시, 액체 질소에 담가 동결시킨 후 분석 전까지 -75°C 냉동고에 보관하였고, 혈액은 안와정맥총으로부터 일정량을 채취하여 이 중 약 500  $\mu$ l를 취하여 적정량의 EDTA를 첨가하여 잘 혼합한 후, 분석 전까지 조직과 같은 방법으로 저장하였다.

### 생체시료로부터의 pCK-VEGF의 분리

동물조직으로부터 plasmid DNA를 분리하기위해 DNA extraction kit(Promega, USA)를 이용하였다. 각 조직에 현탁용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 g/ml RNase A)을 첨가한 후 Dounce homogenizer(Glas-Col Co., USA)를 이용하여 균질화하고 염기성 용액(0.2 M NaOH, 1% SDS)을 첨가하여 세포막을 분해하였다. 중화용액(1.32 M potassium acetate, pH 4.8)을 첨가한 후 10,000 $\times$ g에서 5~10 분간 원심분리하여 상등액을 취하고, 적정량의 bead와 혼합하고 감압을 걸어 kit에 포함된 컬럼에 충전하였다. 세척용액(80 mM potassium acetate, 8.3 mM Tris-HCl, pH 7.5, 40 M EDTA in 55% ethanol)으로 컬럼을 세척한 후 컬럼을 1.5 ml microtube로 옮기고 미리 준비한 40°C TE 완충액(10 mM Tris-HCl, 1

mM EDTA, pH 8.0) 100  $\mu$ l를 가하여 plasmid DNA를 용출, 분리하였다.

### Polymerase chain reaction(PCR)을 이용한 pCK-VEGF의 증폭

생체 시료로부터 정제된 DNA 시료에 pCK-VEGF plasmid DNA의 VEGF165 유전자 직전과 직후 부위의 염기서열로부터 합성된 2개의 primers(5'-GGCTTGTCACATCTGCAAGT-3', 5'-TCTGCTGTCTTGGGTGCATT-3')를 첨가한 후 RTC-100 thermocycler(MJ Research Co., USA) PCR 기기를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 반응을 위한 혼합물에는 250 mM의 dNTP, 50 pmoles의 primers, 2.5 units의 Taq polymerase 등이 100  $\mu$ l의 Taq polymerase buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>)에 포함되게 하였다. PCR 반응은 35 cycle 반복하였으며, 각 cycle마다 denaturation반응은 94°C에서 1분, annealing반응은 56°C에서 1분, extension반응은 74°C에서 1분씩하였다. 반응 후 PCR 생성물(557 bp)은 1% agarose gel상에서의 전기영동 분석법과 Ethidium bromide(EtBr) 염색법으로 VEGF165 유전자임을 확인하였다.

### 밀도 정량을 이용한 분석

밀도를 이용한 정량 분석 프로그램(BioID, version 96, Vilberlourmat Co. France)을 이용하여 직선성 성립 구간내에서 조직내의 pCK-VEGF DNA의 양을 산출하였다.

### 약동력학적 분석

시간 0에서 무한대까지의 혈중농도곡선하 면적(AUC)은 trapezoidal rule extrapolation method에 의하여 구하였다. 이 방법은 혈중 농도가 감소하는 동안에는 logarithmic trapezoidal rule을, 증가하는 동안에는 trapezoidal rule을 사용한다. 마지막 data로부터 무한대까지의 면적은 마지막 농도를 속도상수로 나누어 계산하였다. 반감기와 분포용적의 평균은 조화평균을 이용하여 구하였다.

### 통계 처리

Unpaired data의 평균간에 t-test를 사용하여 통계처리 하였으며, 유의 수준  $p < 0.05$ 으로 판단하였다.

## 실험결과

### pCK-VEGF 정량법의 validation

시료로부터 분리 정제된 pCK-VEGF의 양을 분석하는 데에 사용된 PCR 방법은 약 1pg의 정량한계를 가지며, 0.03~10 ng 구간에서 정량성을 나타내었다(Fig. 1). 조직으로부터의 회수율을 측정하기 위하여, 조직 중에 0.001~10 ng 일정량 가하고 재료 및 방법에 제시된 바와 같이 추출한 후 PCR을 통하여 증폭시키고, agarose gel 상에서 전기영동시켜 densito-

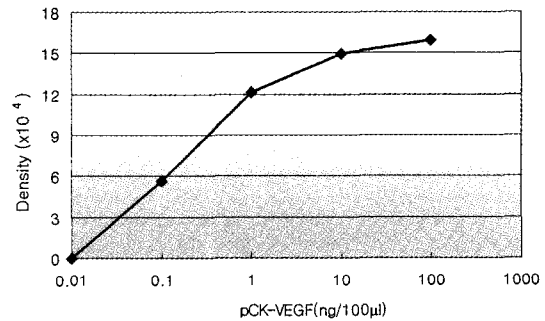
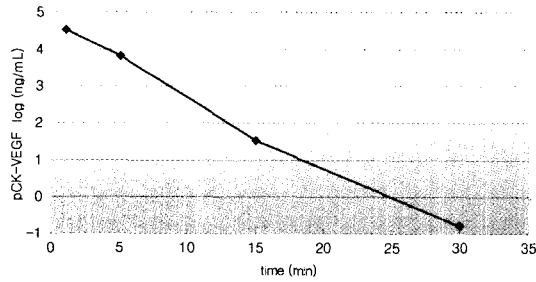


Fig. 1 - Standard curve for quantification using PCR analysis. PCR was performed with various concentrations of template. Samples were separated on 1% agarose gel, and the band intensity was analyzed by densitometry.



Fig. 2 - Agarose gel electrophoresis of pCK-VEGF from tissue spiked with the DNA. Purified DNA from muscle tissue injected with a known concentration of pCK-VEGF was amplified by PCR and separated in 1% agarose gel. Control lanes indicate 10, 1, 0.1 ng of template, respectively. The pCK-VEGF recovery rate from tissue or blood was obtained using this process. 1  $\mu$ g of 1 kb plus DNA ladder (GIBCO BRL) was used as a DNA size marker.



**Fig. 3** – The kinetics of pCK-VEGF in blood after intravenous administration. Following intravenous administration of 100  $\mu$ g of pCK-VEGF, the DNA from ICR male mice blood was isolated at each of the indicated times postinjection. PCR, agarose gel electrophoresis and densitometry were followed the method as mentioned in *Materials and Methods*. The value was converted into the concentration of pCK-VEGF in blood in each time.

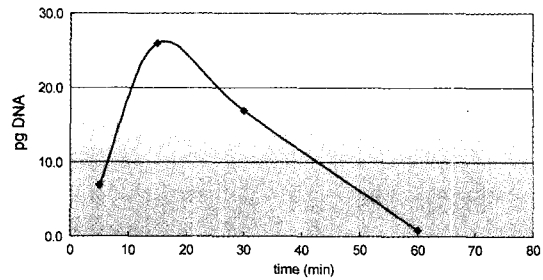
meter로 정량하였다(Fig. 2). 근육 중 농도가 0.001~3 ng인 검체를 이 추출법으로 5회 분리, 정량한 결과 회수율은 약 85.59%이었으며, 표준편차는 약 8.66%이내로 양호한 결과를 나타내었다. 혈액에 대하여 동일한 방법으로 측정된 결과, 1~10 pg의 pCK-VEGF가 포함된 검체로부터는 약 80.18%의 회수율을 보였으나, 1 pg 미만의 검체에서는 낮은 회수율을 나타내었다.

#### 마우스의 정맥투여 후의 약동력학

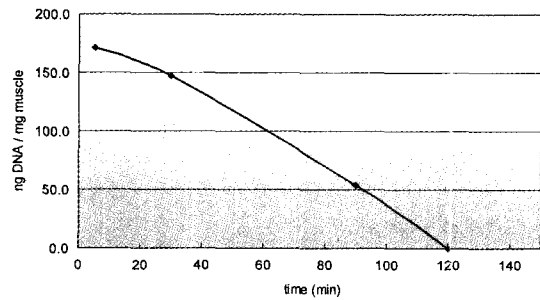
마우스 꼬리 정맥에 pCK-VEGF 100  $\mu$ g/head를 투여한 후, 혈액중의 농도-시간 곡선을 Fig. 3에 나타내었다. 일단 혈액내에 존재하게 되면, 빠른 속도로 분해되기 시작하여, 약  $1.68 \pm 0.51$  min의 혈중 반감기를 보이며, AUC는  $149.5 \pm 102.4$   $\mu$ g·min/ml 이었다.

#### 마우스의 근육내 투여 후 약동력학

마우스 근육에 pCK-VEGF 100  $\mu$ g/head를 투여하여 얻은 혈액중의 농도-시간 곡선을 Fig. 4에 나타내었다. 혈액으로 이행하여 15분에서 혈중 최고농도를 보였고, 혈중 최고 농도는 26 pg/ml이었으며, 빠른 속도로 소실되어 60분 이후에는 관찰되지 않았다. 혈중 반감기는  $6.78 \pm 2.090$  min이었으며, AUC는  $781.9 \pm 327$  pg·min/ml 이었다. 마우스 근육에 pCK-VEGF 100  $\mu$ g/head를 투여한 후, 근육내 농도-시간 곡선을 Fig. 5에 나타내었다. 투여 후 90분에는 투여용량의 약 30%가 투여부위인 근육에 존재하였고, 8시간 후에는 극미량



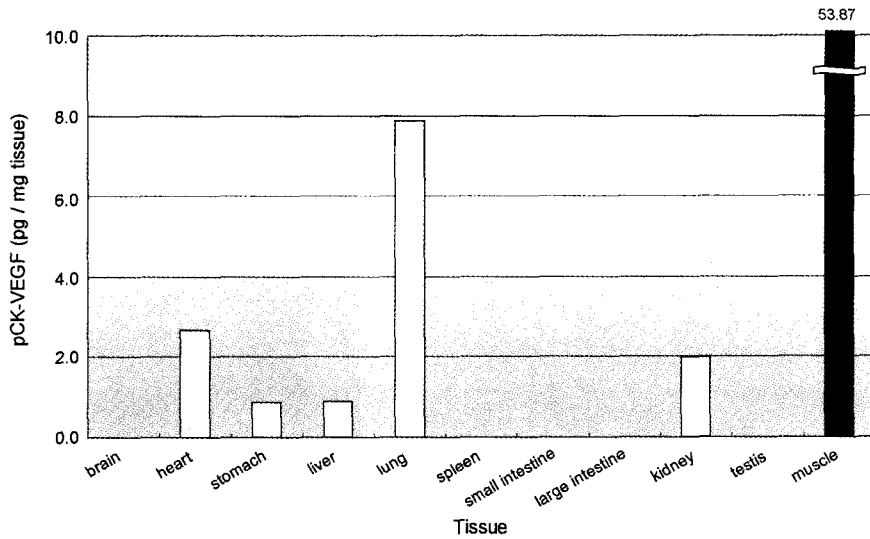
**Fig. 4** – The kinetics of pCK-VEGF in blood after intramuscular administration. Following intramuscular administration of 100  $\mu$ g of pCK-VEGF, the DNA from ICR male mice blood was isolated at each of the indicated times postinjection. Analysis was followed the method as mentioned in *Materials and Methods*. The value was converted into the concentration of pCK-VEGF in blood in each time.



**Fig. 5** – The kinetics of pCK-VEGF in muscle after intramuscular administration. Following intramuscular administration of 100  $\mu$ g of pCK-VEGF, the DNA from ICR male mice muscle was isolated at each of the indicated times postinjection. Analysis was followed the method as mentioned in *Materials and Methods*. The value was converted into the concentration of pCK-VEGF in muscle in each time.

의 DNA만이 검출되었다. 근육에 투여된 pCK-VEGF는 빠른 속도로 근육으로부터 소실되는 것으로 관찰되었는데, 이중 일부는 혈중으로 이행되어 대사되거나 2차적으로 다른 조직에 재분포 되었으며, 많은 양은 근육조직 내에서 대사되는 것으로 나타났다.

근육투여 후 pCK-VEGF의 다른 장기로의 분포 정도는 Fig. 6에 나타난 바와 같다. 투여 후 30분에 pCK-VEGF는 심장, 폐, 신장 등과 같이 혈류량이 많은 장기에서 검출되기 시작하였으나 그 농도는 1 pg/mg 미만이었으며, 투여 후 90분에 최고 농도에 도달하여, 근육을 제외할 때, 폐(7.873 pg/mg tissue), 심장



**Fig. 6** – The tissue distribution of pCK-VEGF. Tissue distribution of pCK-VEGF was analyzed at 90 min postinjection. Following intramuscular administration of 100 µg pCK-VEGF, the DNA from various tissues of ICR male mice was isolated. PCR, agarose gel electrophoresis and densitometry were followed the method as mentioned in *Materials and Methods*. The value was converted into the concentration of pCK-VEGF in tissue.

**Table I** – Existence ratio in organs at 90 min after intermuscular administration

Organ	Existence (%)
Brain	Nd*
heart	0.40
stomach	0.22
liver	0.65
lung	1.62
spleen	nd*
small intestine	nd*
large intestine	nd*
kidney	1.21
testis	nd*
muscle	28.71

The existence ratio of pck-VEGF in respective organs were calculated from the concentration of the DNA in each tissue at 90 min after administration of 100 µg pCK-VEGF. \*nd: non-detected.

(2.680 pg/mg tissue), 신장(1.980 pg/mg tissue) 등에서 단위 조직량에 존재하는 pCK-VEGF 농도가 높았다. 또한, 각 조직의 평균 무게를 고려한 조직 분포율은 폐, 심장, 간 순으로 나타났다. 그러나, 근육을 제외할 때 각 장기에서의 분포율은 약 1.6% 이하로 무시할만한 적은 분포율을 나타내었으며(Table I), 이들은 시간이 경과하면서 빠르게 소실되어 약 8시간 경

과 후에는 거의 모든 장기에서 검출되지 않았다.

### 고 찰

본 연구는 국내 최초로 시도되는 허혈성 지체질환 유전자 치료제인 pCK-VEGF의 생체내 동태에 관한 연구로서 혈액 또는 조직에서의 약동력학적 반감기와 타장기로의 분포 및 소실을 관찰하여, pCK-VEGF의 흡수와 분포의 변화를 알아보려고 하였다.

pCK-VEGF는 정맥주사 후 빠른 속도로 분해되어, 혈중 반감기가 매우 짧았으며(1.68±0.507 min), 투여 후 30분이 경과하면 intact plasmid로는 관찰되지 않았는데(정량한계는 약 1 pg), 이러한 혈액중에서의 빠른 소실은 혈중에 존재하는 핵산 분해 효소(nuclease)의 작용에 의한 것으로 생각되며, MHC class I 유전자를 사용한 암유전자치료제에서의 결과와 유사하다.<sup>12)</sup>

pCK-VEGF를 근육 투여하면, 혈중으로 이행한 후 다시 각 조직으로 분포하여, 약 90분 경과 후에 조직내 농도가 최고에 달하고, 120분을 경과하면서 모든 조직에서 사라지기 시작하여 8시간 경과후에는 검출되지 않았다. 주로, 분포되어 높은 농도에 달한 조직은 폐, 신장, 심장, 간 등 이었으며, 뇌, 비장, 소장, 대장, 고환 등에서는 관찰되지 않았다. 허혈성 지체질환 치

료 목적으로 사용되는 pCK-VEGF의 예상 임상용량은 허혈부위에 2 mg씩 2회 근육주사로 예측되므로, 본 시험조건에서의 투여용량(100 µg/head)은 3 mg/kg정도이며 환자 체중을 60 kg으로 환산하였을 때 임상용량의 약 45배에 해당하는 높은 용량이다. 또한 임상적용에 있어 허혈부위는 혈행이 억제되어, 국소 근육 주사후 전신혈을 통한 다른 장기로의 pCK-VEGF의 이행은 더욱 감소될 것으로 예측된다. pCK-VEGF는 혈액 및 조직중에서 빠르게 분해되고 다른 장기로의 분포가 낮다는 것을 고려할 때, 임상적용에 있어 다른 장기로 이행하여 VEGF 발현을 촉진하거나 다른 장기에서의 약리작용에 기인한 부작용 발현의 위험성은 매우 낮을 것으로 판단된다. 투여부위인 근육에는 투여 후 90분에 투여량의 30% 정도가 잔류하였으며, 8시간이후에도 미량의 DNA가 검출되었는데, 이 결과는 DNA luciferase expression vector를 마우스 근육에 투여하여 흡수 및 분포를 관찰하여 fg이하의 정량한계로서 30일까지 plasmid의 존재를 확인하고, 60일까지 luciferase의 활성이 발현되는 것을 확인하였던 이전의 발표 내용과 유사하다.<sup>13)</sup>

결론적으로, pCK-VEGF는 생체 내에 투여할 경우 원체는 혈액과 장기내에서 빠르게 소실되며, 투여 부위인 근육에서는 고농도로 8시간까지 고농도로 유지되어 유전자의 발현을 유도함으로써 신생혈관 조성을 나타내는 유전자 치료법으로 효용성이 클 것으로 예상된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 보건복지부, 산업자원부와 과학기술부의 지원에 의해서 수행되었다.

### 문 헌

- 1) Criqui, M. H., Fronek A., Batret-Connor, E. K., Klauber M. R., Gabriel S. and Goodman D. The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation* **71**, 510 (1985).
- 2) European Working Group on Critical Leg Ischemia. Second edition consensus document on chronic critical leg ischemia, *Circulation*, **84**, IV-1, IV-26 (1991).
- 3) Lee, J. S. and Feldman, A. M. Gene therapy for therapeutic myocardial angiogenesis : a promising synthesis of two emerging technologies. *Nat. Med.* **4**(6), 739 (1998).
- 4) Baumgartner, I., Pieczek, A., Manor, O., Blair, R., Kearney, M., Walsh, K. and Isner, J. M. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in the patients with critical limb ischemia, *Circulation*, **97**, 1114 (1998).
- 5) Carmeliet P. and Collen D. Role of vascular endothelial Growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **237**, 133 (1999).
- 6) Takeshita, Satoshi; Pu, Li-Qun; Stein, Lawrence A.; Sniderman, Allan D.; Bunting, Stuart; Ferrara, Napoleone; Isner, Jeffrey M.; Symes, James F. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation*, **90**, 5(Pt. 2), II228-II234 (1994).
- 7) Losordo, D. W., Vale, P. R., Symes, J. F., Dunnington, C. H., Esakof, D. D., Maysky, M., Ashare, A. B., Lathi, K., Isner, J. M. Gene therapy for myocardial angiogenesis initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*, **98**, 2800 (1998).
- 8) 이영주, 박은진, 조홍찬, 서연립, 김덕경, 김선영. Naked DNA를 이용한 말초동맥질환 치료용 VEGF 발현백터의 안전성시험. *J. Toxicol. Pub. Health*, **15**, 373 (1999).
- 9) Lee, Y., Park, E. J., Yu, S. S., Kim, D. K., and Kim, S. Improved expression of vascular endothelial growth factor by naked DNA in mouse skeletal muscles: Implication for gene therapy of ischemic disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **272**, 230 (2000).
- 10) Sambrook J., Fritsch E. F. and T. Maniatis. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold spring harbor laboratories press, New York.
- 11) Isner J. M., Ann P., Robert S., Richard B., Laura H., Takayuki A., Kenneth R., Syed R., Kenneth W. and James F. S. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. *Lancet* **348**, 370 (1996).
- 12) Lew, D., Parker, S. E., Latimer, T., Abai, A. M.,

- Kuwahara-Rundeli, A., Doh, S. G., Yang, Z. Y., Laface, D., Gromkowski, S. H., Nabel, G. J., Manthorpe, M. and Norman, Cancer gene therapy using plasmid DNA: pharmacokinetic study of DNA following injection in mice. *Hum. Gene Ther.* **6**, 553 (1995).
- 13) Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felgner, P. L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, **247**, 1465-1468 (1990).