

생체고분자를 이용한 유전자 전달체의 개발

김진석

1. 서 론

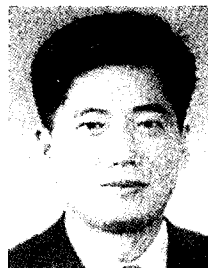
유전자를 이용하여 필수 단백질(성장인자, 암 전이억제단백질, 효소 등)의 생성을 유도하거나 또는 불필요한 단백질(oncogene product 등)의 생성을 억제함으로써 인간의 질병을 치료하고자 하는 의료 행위를 통칭하여 “유전자 치료법(gene therapy)” 이라고 한다. 이러한 유전자 치료법이 성공적인 효과를 거두기 위한 3가지 필수요건을 들면, i) 치료 유전자의 발굴, ii) 안전하고 효과적인 delivery system의 개발, iii) 적절한 투여계획설립 및 임상적 치료전략이라 할 수 있다. 미국의 에너지성(DOE)과 국립보건원(NIH)이 중심이 되어 약 30억 달러(한화 약3조6천억 원)라는 엄청난 규모의 예산을 투입하면서 연구를 진행하고 있는 인간게놈프로젝트(human genome project)가 성공리에 끝나면, 인간유전자의 염기서열을 포함한 구조적 규명과 기능유전자의 조절분석을 토대로 많은 유전자 결합에 의한 질병의 진단이 가능해 질 것이고, 그 결과 치료유전자는 더욱 활발히 발굴될 것으로 전망된다. 이미 22번 염색체의 염기서열이 거의 완성(almost continuous)되어 지난 1999년 12월 2일자 Nature지에 발표가 되었고,¹ 21번 염색체의 염기서열 또한 2000년 5월 18일자 Nature지에 발표가 되었다.² 이로써 22번 염색체의 이상에 의해 유발되는 것으로 알려져 있는 만성 백혈병(chronic myeloid leukemia), 정신분열증(schizophrenia) 등의 질병과, 21번 염색체의 이상에 의해 유발되는 것으로 알려져 있는 다운증후군 및 알츠하이머 등의 질

병에 대한 유전자치료법의 가능성을 한층 높여주기도 하였다. 단지 문제는 이러한 질병에 대한 치료유전자가 밝혀지더라도 환자의 체내로 제대로 주입시켜 줄 수 있는 delivery vector의 개발이 뒤따르지 않으면 치료효과를 얻을 수 없다는 것이다. 따라서, 효율적이고 안전한 delivery vector의 개발이야말로 인간게놈프로젝트를 비롯한 많은 유전자 관련 연구가 최종결실을 맺을 수 있게 해주는 고부가가치 연구과제가 아닐 수 없다.

본 논문에서는 이러한 유전자치료를 사용하는 delivery system 중 특히 생체 고분자(biopolymer)를 이용한 여러 가지 유전자 전달체에 대해 고찰해 보 고자 한다.

2. 본 론

유전자전달에 사용되는 delivery system은 크게 비바이러스와 바이러스성 전달체로 나눌 수가 있고,



김진석

1985 부산대학교 약학대학(학사)
 1987 부산대학교 약대학원(석사)
 1989~ University of Wisconsin
 1994 Madison(박사)
 1995~ University of Utah(Post-
 1997 Doc.)
 1997 (주)삼양사 의약사업부
 1998 식품의약품안전청 연구관
 1999~ 숙명여자대학교 약학대학 조교수
 현재

Development of Gene Delivery Systems Using Biopolymers

숙명여자대학교 약학대학(Jin Seok Kim, College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Chungpa-dong 2-ka, Yongsan-ku, Seoul 140-742, Korea)

표 1. History of Gene Therapy Related Process

Year	Event	References
1944	Gene can be transferred within nucleic acid	3
1961	Foreign DNA can stably be integrated into mammalian genome	4
1979	Human β -globin gene can be transferred into murine bone marrow cells by chemical transfection method	5
1981	Retroviral vectors were used to transfect mammalian cells with foreign genes	6
1987	Synthesis of a cationic lipid, DOTMA	7
1990	Adenosine deaminase gene therapy trial was initiated	8
1992	First clinical trial using non-viral gene delivery vector, DC-Chol/DOPE cationic liposome	9

역사적으로 볼 때는 바이러스성 전달체의 개발이 시기적으로 훨씬 앞서 진행되었다(표 1).

2.1 바이러스성 전달체

바이러스성 전달체는 공통적으로 replication-defective한 바이러스를 이용하며 viral coding sequence의 일부 혹은 전부가 치료용 유전자로 치환되어 있다. 이러한 바이러스를 유전자치료에 많이 이용하는 이유는 유전물질 전달효율이 매우 뛰어나기 때문이다. 하지만, 이러한 바이러스는 치명적인 몇몇 단점들도 있는 것으로 알려져 있다. 예를 들면 많은 환자들이 사용할 수 있을 정도의 대량생산이 고농도로 이루어지지 않는다는 점, 독성문제, 그리고 불활화한 바이러스가 잠재적으로 가지고 있는 replication 가능성 등이다. 대표적인 viral vector의 예를 들어 보면 다음과 같다.

2.1.1 Retrovirus

레트로바이러스는 eukaryotic RNA 바이러스로, viral enzyme을 이용하여 DNA를 만들고 이를 숙주세포의 genome에 integrate시킨다.¹⁰ 이러한 레트로바이러스의 장점은 stable transfection을 일으켜 장기간 외부 유전자를 후손에게 전달시킬 수 있지만 활동적인 분화를 하고 있는 세포만 주로 transfection시키는 단점도 있다.¹¹

2.1.2 Adenovirus

아데노바이러스는 20면체 바이러스로 큰 DNA genome을 가지고 있다. 레트로바이러스와는 달리 활동적인 분화를 하지 않는 세포까지도 transfection시

킬 수 있는 장점을 가지고 있다.¹² 하지만, host genome에 integration 되지 않아 짧은 기간 동안만 유전발현(gene expression)이 유지되는 점이 특징이다. 또한, 숙주 세포에서 면역반응을 일으켜서 반복된 투여를 제한하게 하는 단점도 있다.¹³

2.1.3 Adeno-Associated Virus

AAV는 크기가 작은 비병원성 DNA 바이러스로 아데노바이러스나 herpes 바이러스와 같은 helper 바이러스의 존재 하에서만 progeny를 생산해 낼 수 있는 바이러스이다. 이 바이러스 또한 분화하는 세포 및 분화를 하지 않는 세포까지도 transfection시킬 수 있는 장점을 가지고 있지만, 치료 목적의 고농도까지 생산하기가 힘든 점과 봉입할 수 있는 DNA의 크기가 약 5 kb 정도로 한정되는 점 등이 단점으로 지적되고 있다.

2.1.4 기타 Viral Vector

그 외에도 herpes-simplex virus, vaccinia virus, lenti virus 등도 각각의 장단점을 지니고 여러 유전자 치료 분야에서 사용되고 있는 실정이다.

2.2 비바이러스성 전달체

앞서 언급한 바이러스 벡터의 단점들로 인해 최근에는 비바이러스성 유전자 전달체에 관한 관심이 높아져 가고 있는 상황인데, 이러한 비바이러스성 유전자 전달체의 공통적 장점으로는 면역반응을 덜 야기하고, 급성독성이 덜 나타나며, 간단하고, 대량생산이 가능하다는 점 등이다. 물론 바이러스성 전달체에 비해 transfection 효율이 떨어지고 유전자 발현이 일시적(transient)이라는 단점은 앞으로 풀어야 할 가장 큰 과제들이다.

2.2.1 Naked DNA

흔히 free DNA라고 이야기하는 naked DNA는 skeletal muscle이나, 간, 또는 심근세포로 유전물질을 전달하는데 많이 이용되고 있다. 이들은 보통 암세포 등에 직접 주입하기도 하고, 만약 전신 혈로 주입할 경우는 endonuclease로부터의 DNA분해를 막는 장치가 필요하다.

2.2.2 Gene Gun

이 방법은 주로 물리적인 힘, 예를 들어 ballistic 투하방법이나 유전자 권총(gene gun) 등을 통해 세포 속으로 유전물질을 주입하는 것인데, DNA를 보통 금(gold)으로 코팅하여 전달시킨다. 이 방법의 가장 큰 단점은 표적세포가 물리적인 방법이나 수술적인 방법으로 바깥으로 노출되어있어야 한다는 점이다.

2.2.3 Liposome/DNA Complex(Lipoplex)

주로 양 전하를 띤 리포솜과 음 하전을 띤 유전물질 사이의 전기적인 결합을 이용하여 크기가 작고 하전(charge)도 중성에 가까운 입자를 만들어 표적 세포로 쉽게 들어갈 수 있게 하는 방법이다. 사용되는 지질의 종류는 4급 암모늄 계열이나, 콜레스테롤 유도체, 혹은 폴리아민의 지질유도체 등이 있고, 종종 보조 지질인 helper lipid로 dioleoyl phosphatidylethanolamine(DOPE)를 함께 사용하면 transfection 효율의 증대를 가져오는 경우가 많다.

2.2.4 Polymer/DNA Complex(Polyplex)

몇몇 양성 합성 혹은 천연 고분자 물질 또한 DNA와 안정한 복합체를 형성하여 표적세포로 잘 전달해 주는 경우가 있는데, 대표적인 물질로는 gelatin, chitosan, poly-*L*-lysine(PLL), polyethyleneimine(PEI), starburst dendrimer 등이 있는데, 이들에 대한 좀 더 상세한 역할이나 transfection 효율 정도 등은 다음 장에서 알아보기로 한다.

2.2.4.1 Gelatin

젤라틴은 콜라겐(collagen)의 변성된 형태인데 체온 부근인 35-40°C 근처에서 겔화되는 양성 전해질(polyampholyte)이다. 주된 음 전하 잔기는 aspartic acid와 glutamic acid이고 주된 양 전하 잔기는 lysine과 arginine이다. 보통 pH 5 이하에서는 양 전하를 띠고 있어 DNA를 섞어주면 고분자가 풍부한 상(polymer-rich phase), 즉 coacervate와 고분자가 결핍된 상(polymer-poor phase), 즉 상등액으로 분리되는데 이러한 현상은 nanosphere나 microsphere를 만드는데 유용한 기술로 이용될 수도 있다. 겔화가 일어나는 체온 부근의 온도에서는 젤라틴의 2차 구조가 거의 없어 단백질 분해효소에 의한 분해도 잘 일어나기도 하고, 수용액 상태에서는 가수분해도 일어나 쉽게 분해되는 단점을 가지고 있다.

2.2.4.2 Chitosan

키토산은 자연적으로 존재하는 다당체인데 키토인(chitin)을 탈 아세틸화함으로써 생성된다.¹⁴ 이는 *N*-acetylglucosamine과 glucosamine이 β -1,4-glycosidic 결합으로 된 단위로 구성되어 있는데, 초기에는 고분자 키토산이나 특정 염 형태의 키토산이 세포독성이 강하고 용혈작용이 있음이 보고된 적도 있으나,¹⁵ DNA와 복합체를 형성하고 이러한 복합체가 DNase에 의한 분해를 억제해주는 효과가 보고된 바도 있다.

2.2.4.3 Poly-*L*-Lysine(PLL)

생분해성 천연고분자중의 하나인 PLL은 초기 G. Wu 박사 등에 의해 PLL과 여러 가지 리간드의 결합체 형태로 DNA의 전달에 많이 이용되었다.^{16,17} 이들은 asialoglycoprotein(ASGP)을 결합시킨 PLL을 이용하여 hepatocyte에 유전물질을 delivery하였는데, 이러한 ASGP-PLL 결합체는 정전기적 인력에 의한 결합체로써 간세포에 산재되어 있는 ASGP-receptor를 통한 receptor-mediated endocytosis에 의해 세포 내로 들어감을 밝혔다. 이후 이들 및 다른 연구자들은 각종 다른 리간드를 물리적 혹은 화학적으로 PLL에 결합시킨 결합체를 만들었는데 사용된 대표적인 리간드에는 transferrin, insulin, immunoglobulin, folate, lectin, virus, viral fusion protein 등이 있다.¹⁸⁻²⁴ 더욱 최근에는 소수성으로 변환시킨 low density lipoprotein(LDL)과 PLL사이의 소수성 결합을 이용한 시스템(일명 Terplex System)이 개발되어 특히 평활근 세포의 LDL-receptor를 이용한 유전물질의 delivery에 이용되기도 하였다.²⁵ 또한 PLL에 다당류(polysaccharide)를 결합시킨 공중합체를 이용하여 지름이 약 100 nm 이하인 nanoparticle을 만들어 이용하기도 하였다.²⁶ 그리고 PLL의 *in vivo* circulation을 더 길게 하기 위한 노력으로 polyethylene glycol(PEG)를 결합시킨 PEG-g-PLL도 합성되어 유전자전달 효율도 입증된 바가 있다.²⁷

2.2.4.4 Polyethylenimine(PEI)

PEI의 합성은 aziridine의 산-촉매 고분자화 반응에 의해 생성되며, ethylamine을 반복단위로 함유하고 있어 물에도 잘 녹는 성질을 지니고 있는 합성고분자이다. 그리고 그 구조에서 볼 수 있듯이 매 3번째 원소가 질소(amino nitrogen)이어서 높은 양 전하를 띠고 있고 그래서 DNA와의 복합체 형성이 용이하다. 여러 형태의 PEI, 즉 linear나 branched, 그리고 여러 분자량의 PEI가 사용되고 있는데 그 중에서 특히 분자량 22,000-25,000의 linear 혹은 branched PEI가 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo* transfection에서도 뛰어난 효율을 나타내는 것으로 알려져 있다.²⁸ PLL과 마찬가지로 PEI도 여러 가지 리간드와 결합한 형태로 targeted gene delivery에 이용되어 왔는데 asialoglycoprotein receptor를 target으로 하거나,¹⁶⁻¹⁸ galactose를 사용한 경우 등이 대표적이다.³⁰

2.2.4.5 Dendrimers

Polyamidoamine dendrimer는 처음 비선형 양성 고분자로 흔히 Starburst로 더 잘 알려져 있다. 이는 ammonia 핵으로부터 시작하여 연속적으로 methyl acrylate와 ethylenediamine을 넣어 줌으로써 합성할 수 있는데, 반응물을 정확히 정량적으로 첨가가 가능하므로 반응산물(product) 또한 정확한 지름, 분자량 그리고 terminal amine의 개수를 가진 구형의 고분자를 합성할 수 있다.^{31,32} 이러한 dendrimer와 DNA의 복합체의 형성기전 또한 terminal amine의 양 하전과 DNA의 음 하전에 의한 이온성 결합으로 compact한 크기의 DNA 복합체(지름 약 200 nm)를 형성하는 것으로 알려져 있다. 이러한 장점으로 인해 여러 세대(generation)의 dendrimer가 유전물질 전달에 사용되어 왔는데, 특히 제5세대와 제6세대 dendrimer가 높은 transfection 효율을 보였다. 이러한 dendrimer의 transfection 효율을 더욱더 높이기 위해 GALA와 같은 합성 amphipathic peptide를 공유결합시킨 복합체를 이용한 경우도 있다. 이 경우, GALA는 endosome이나 lysosome과 같은 낮은 pH 환경에서 막을 불안정화시켜 그 구조 속에 잡혀 있는 내용물이 쉽게 세포질로 빠져나갈 수 있게 도와주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 물론 이러한 목적으로 도입된 peptide에 의한 immunogenicity 여부는 계속 연구되어야 할 부분이다.

3. 결 론

위에서 여러 가지 형태의 유전자 수송시스템을 설명하였고 특히 천연 및 합성 고분자를 이용한 delivery system을 많이 설명하였는데, delivery system의 종류에 관계없이 성공적인 유전자치료가 되기 위해서는 넘어야 할 장벽이 여러 군데 있다. 투여부위에서부터 작용부위까지 유전물질을 분해되지 않게 성공적으로 수송하여야 하고, 목표세포에 도달하여서는 세포 속으로 효율적으로 endocytosis가 되어야 하며, 세포 내에서는 endosome이나 lysosome에 있는 분해효소에 의해 분해되지 않고 안전하게 핵막을 뚫고 핵 속으로 들어가야 한다. 핵 속으로 들어간 DNA는 transcription을 거쳐 mRNA를 만들어 내고 다시 세포질 속으로 빠져나와 translation을 거쳐 원하는 단백질을 만들어낸다. 물론 antisense oligonucleotide를 수송하는 경우에는 target

mRNA가 세포질 속에 많이 존재하므로 굳이 핵 속으로 들어가지 않아도 소기의 목적을 달성할 수 있다. 문제는 여기서 그치지 않고 DNA를 안전하게 수송한 후에 수송에 사용된 delivery system의 거처 문제이다. 앞서 설명한대로 많은 합성 delivery system은 양 이온성 하전을 띠고 있는데, 목표지점에서 DNA를 release한 후에 남아있는 delivery system은 핵 내의 fragmented chromosomal DNA나 다른 음 하전성 물질과 여러 형태의 결합(혹은 반응)을 할 수도 있다는 점이다. 다행히 delivery system은 핵 속으로 들어가지 않고 DNA만 들어간다면 문제가 되지 않겠지만, 일부 보고에 의하면(특히 PEI의 경우) delivery system도 DNA와 함께 핵 속으로 들어가는 것으로 알려져 있어, 다른 비슷한 형태의 delivery system도 핵 속으로 들어가는 가능성을 전혀 배제할 수는 없을 것으로 생각된다. 만일 이러한 것이 실험적으로 입증된다면, 항상 안전하다고만 여겨져 왔던 비바이러스성 gene delivery system의 안전성 면에도 더욱 근본적이고 철저한 연구가 진행되어야 할 것이다. 또한, 유전자 발현 증대를 목적으로 부가하는 리간드의 결합으로 인해 생길 수 있는 각종 면역반응에 대한 연구도 이러한 시스템의 *in vivo* 응용 전에 필수적으로 해결해야 하는 문제점으로 지적되고 있다. 앞서 언급한 바와 같이 이러한 리간드의 대부분은 peptide나 protein(혹은 protein fragment)이므로, 이러한 단백질이 혈관 내로 들어가면 체내의 각종 면역 반응 메커니즘이 작동되어 반복투여를 저지하려는 여러 가지 생체 내 현상(과민반응, 발열, 오한 등)들이 생길 수 있다.

마지막으로 언급하고자 하는 것은, 유전물질을 체내로 수송하여 그 역할을 할 수 있게 하는데는 그 수송도구가 바이러스를 이용하는지 혹은 비바이러스를 이용하는지가 중요한 게 아니라 얼마나 안전하고 효율적으로 그 임무를 수행하느냐에 달려있다. 이러한 “안전성과 효율성(safety and efficacy)”이 보장되지만 하면 때로는 비바이러스성 전달체에 바이러스성 입자가 가미된 “hybrid system” 혹은 “fusion system”의 구상도 의미가 매우 크다고 할 수 있다. 이미 일부 바이러스의 표면 단백질을 비바이러스성 전달체에 결합시키거나, 바이러스 자체를 첨가하여 비바이러스성 전달체의 효율을 증대시킨 보고가 있기는 하지만, 앞으로 더욱더 이 분야의 연구가 진행되어야 된다고 생각된다. 그래서, 비바이러스

전달체의 가장 큰 약점인 낮은 transfection 효율을 개선시키고, 아울러 바이러스 전달체의 가장 큰 약점인 잠재된 안전성 문제를 극복한다면 현재 이루어 놓은 인간게놈프로젝트의 결과를 한층 더 빛낼 수 있는 유전자치료법이 개발될 수 있으리라 생각된다. 그렇게 되면, 고통받는 환자의 입장에서는 보다 쉽고 안전하며 값싼 방법으로 기존의 치료법으로 불가능했던 각종 유전질환이나 암 등으로부터 구원될 수 있는 길이 열릴 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글: 본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(HMP-99-B-02-0002).

참 고 문 헌

- I. Dunham, N. Shimizu, B.A. Roe, S. Chisoe, *et al.*, *Nature*, **402**, 489 (1999).
- M. Hattori, *et al.*, *Nature*, **405**, 311 (2000).
- O. T. Avery, C. M. MacLeod, and M. McCarty, *I. Exp. Med.*, **79**, 137 (1944).
- E. R. Kay, *Nature*, **191**, 387 (1961).
- M. L. Cline, H. Stang, K. Mercola, L. Morse, R. Ruprecht, J. Brown, and W. Salser, *Nature*, **284**, 422 (1980).
- K. Shimotohno and H. M. Temin, *Cell*, **26**, 67 (1981).
- P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wernz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, and M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7413 (1987).
- K. W. Culver, M. Berger, A. D. Miller, W. R. Anderson, and R. M. Blaese, *Pediatr. Res.*, **31**, 149A (1992).
- G. J. Nabel, E. G. Nabel, Z.-Y. Yang, B. A. Fox, G. E. Plauts, X. Gao, L. Huang, S. Shu, D. Gordon, and A. E. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11307 (1993).
- H. Varmus, *Science*, **240**, 1427 (1988).
- W. F. Anderson, *Science*, **256**, 808 (1992).
- A. Grunhaus and M.S. Horwitz, *Semin. Virol.*, **3**, 237 (1992).
- M. D. Schneider and B. A. French, *Circulation*, **88**, 1937 (1993).
- O. Skaugrud, *Manuf. Chem.*, **60**, 31 (1989).
- B. Carreno-Gomez and R. Duncan, *Int. J. Pharm.*, **148**, 231 (1997).
- G. Y. Wu and C. H. Wu, *J. Biol. Chem.*, **262**, 4429 (1987).
- G. Y. Wu and C. H. Wu, *J. Biol. Chem.*, **263**, 14621 (1988).
- E. Wagner, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3410 (1990).
- M. Cotten, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6094 (1992).
- P. Midoux, *Nucleic Acid Res.*, **21**, 871 (1993).
- Y. Rojanasakul, *et al.*, *Pharm. Res.*, **11**, 1731 (1994).
- W. Zauner, *et al.*, *J. Virol.*, **69**, 1085 (1995).
- K. J. Fisher and J. M. Wilson, *Biochem. J.*, **321**, 49 (1997).
- S. W. Ebbinghais, *et al.*, *Gene Ther.*, **3**, 282 (1996).
- J. S. Kim, A. Maruyama, T. Akaike, and S. W. Kim, *J. Cont. Rel.*, **47**, 51 (1997).
- A. Maruyama, T. Ishihara, J. S. Kim, S. W. Kim, and T. Akaike, *Bioconjugate Chem.*, **8**(5), 735 (1997).
- Y. H. Choi, F. Liu, J. S. Kim, Y. K. Choi, J. S. Park, and S. W. Kim, *J. Cont. Rel.*, **54**, 39 (1998).
- O. Boussif, M. A. Zantaamd, and J. P. Behr, *Gene Ther.*, **3**, 1074 (1996).
- B. Abdallah, A. Hassan, C. Benoist, D. Goula, J. P. Behr, and B. A. Demeneix, *Human Gene Ther.*, **7**, 1947 (1996).
- M. A. Zanta, O. Boussif, A. Adib, and J. P. Behr, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 839 (1997).
- D. A. Tomalia, A. M. Naylor, and W. A. Goddard, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **29**, 138 (1990).
- R. F. Service, *Science*, **267**, 458 (1995).