

플라스미드 유전자를 함유한 리포솜의 제조 및 특성

박효민 · 정수연 · 고은정 · 이화정[†]

이화여자대학교 약학대학

(2003년 6월 12일 접수 · 2003년 8월 20일 승인)

Preparation and Characterization of Plasmid DNA Encapsulated in Liposomes

Hyo Min Park, Soo Yeon Chung, Eun Jung Go and Hwa Jeong Lee[†]

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

(Received June 12, 2003 · Accepted August 20, 2003)

ABSTRACT—The objective of this study was to construct the pegylated liposomes containing plasmid DNA with optimal encapsulation efficiency. Plasmid DNA (pGL2 clone 753, ~6 kb) was encapsulated by the freeze/thawing method into liposomes composed of 1-palmitoyl-2-oleyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (POPC), didodecyl dimethyl ammonium bromide (DDAB), distearoylphosphatidyl ethanolamine polyethylene glycol 2000 (DSPE-PEG 2000) and DSPE-PEG 2000-maleimide. The liposomes containing plasmid DNA were then extruded through two stacked polycarbonate filters with series of different pore sizes to control the liposome size. The plasmid DNA entrapped in the liposomes was separated from free plasmid DNA by Sephadex CL-4B column chromatography. The decreased pore size of polycarbonate filters resulted in the decreased size of liposomes. The encapsulation efficiency was markedly affected by the cationic lipid (DDAB) concentration, but to a low degree by the size of liposomes and by the amount of plasmid DNA.

Key words—Plasmid DNA, Liposomes, Encapsulation

유전자 치료는 기존의 치료법으로는 해결할 수 없는 질병에 대한 새로운 치료 방법으로 대두되고 있다. 현재까지 주로 연구되어진 유전자 치료는 recombinant viral vector들을 이용한 것으로서 이와 같은 viral vector들은 원하는 세포 내로 치료에 유용한 유전형질을 투입하는 데는 효율적이거나 인체에 사용 시 안전성에 대한 문제가 제기된다.¹⁻¹⁰⁾

이와 같은 문제를 해결하기 위하여 양이온성 지질이나 고분자를 non-viral vector로 이용한 연구가 또한 진행되어 왔다. Non-viral vector는 대량 생산이 가능하며 사용이 용이하고 특수한 면역 반응을 일으키지 않는 등의 장점을 가지고 있으며 이는 음이온성인 유전자와 정전기력을 이용한 복합체(lipoplex 또는 polyplex)를 형성하여 유전자를 원하는 세포에 전달하도록 설계된다. 그러나 이와 같은 복합체는 혈액 내에서 혈청 단백질들과의 상호작용을 통해 유전자를 혈액 중에 방출하거나 혹은 집합체를 형성하여 선택적으로 폐에서만 주로 유전자를 발현하고 기타 다른 기관에서의 유전자의 전달은 상대적으로 감소하는 것으로 보고되고 있다. 또한, 이와 같은 lipoplex 혹은 polyplex는 세망내피계에 의해 생체 내에서 신속하게 제거되며 원하는 세포로의 선택적 전

달 및 그 세포 내로의 유전형질의 도입이 viral vector들에 비해 상당히 낮은 편이다.¹⁰⁻¹¹⁾

그러므로, 효과적인 유전자 치료를 위해서는 먼저 유전자 전달 시스템이 생체 적용 시 안전하며 혈액 중에서 붕괴되지 않고 장시간 체류해야 하며 또한 유전자를 선택적으로 원하는 세포로만 전달하도록 설계되어야 한다. 본 연구에서는 생체 적용 시 안전하며 혈액 중에서 장시간 체류할 수 있는 유전자 전달 시스템 개발을 위한 기초 연구로서 유전자를 봉입한 리포솜의 제조 및 특성에 관한 연구를 수행하였다.

실험 방법

시약 및 기기

중성 지질인 POPC (1-palmitoyl-2-oleyl-sn-glycerol-3-phosphocholine) 및 양성 지질인 DDAB (didodecyl dimethyl ammonium bromide)는 Avanti Polar Lipids (USA)사로부터, DSPE-PEG 2000 (distearoyl phosphatidyl ethanolamine polyethylene glycol 2000) 및 DSPE-PEG 2000-maleimide는 Shearwater Polymers (USA)사로부터 구입하였다. [α -³²P] dCTP는 Perkin Elmer Life Sciences (USA)사로부터, Microscint 40은 Packard (USA)사로부터, Nick translation system은 Invitrogen (USA)사로부터 구입하였다. Pancreatic DNAase

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)3277-3409, E-mail : hwalce@ewha.ac.kr

I, Exonuclease III 및 Wizard Plus midipreps DNA purification system은 Promega (USA)사로부터, Protein G Sepharose CL-4B는 Amersham Pharmacia (USA)사로부터, 암피실린 및 LB broth powder는 USB (USA)사로부터 공급되었다. Econo chromatography column (1.5×10 cm)은 Bio-Rad (USA)사로부터, Sephadex G-25 quick spin column은 Roche Applied Science (Germany)사로부터, Liposofast extruder는 Avestin (Canada)사로부터 구입하였다. 기기로는 원심분리기 (VS 5000, Vision Science, Korea), 제타전위계 (380 ZLS, PSS-NICOM, USA), 초음파 분쇄기 (Branson 3210, USA), 순환 수조 (VWR 1155, USA), 분광광도계 (DU-18, Beckman, USA) 및 방사선 측정기 (Topcount NXT, Packard, USA) 등을 사용하였다.

플라스미드 유전자 제조 및 방사성 동위원소 표식

플라스미드 유전자(pGL2 clone 753)로 transform된 *E. Coli*를 암피실린을 함유한 LB media에 넣은 후 37°C에서 약 16–20시간 동안 배양하였다. 플라스미드 유전자를 maxi-preparation 방법에 의해 Wizard Plus midipreps DNA purification system를 사용하여 *E. Coli*로부터 정제하였다. 정제된 플라스미드 유전자의 양은 유전자를 TE buffer [10 mM Tris/1 mM EDTA(pH 8.0)]에 용해시킨 후 260 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

플라스미드 유전자는 DNA polymerase I 및 DNase I을 사용하여 nick translation 방법에 의해 [α - 32 P]dCTP로 표식하였다. 이 때, 결합되지 않은 뉴클레오티드 (nucleotide)는 G25 Sephadex column에 의해 제거하였다. 소량의 32 P로 표식된 유전자(32 P-DNA)는 리포솜 내에 봉입된 플라스미드 유전자의 양을 측정하기 위해 사용하였다.¹²⁾

플라스미드 유전자의 리포솜 내로의 봉입

POPC (17.8 μ mole–19.0 μ mole), DDAB (0.2 μ mole–1.4 μ mole), DSPE-PEG 2000 (0.6 μ mole) 및 DSPE-PEG 2000-maleimide (0.2 μ mole)를 클로로포름에 녹여 혼합한 후 질소기류 하에서 건조시켰다. 건조된 지질들에 0.05 M Tris (pH 7.0) 용액 200 μ L을 넣어 분산시킨 후 2분 동안 초음파 분쇄하였다. 일정량의 플라스미드 유전자와 32 P로 표식된 유전자 (32 P-DNA) 1 μ Ci를 분산된 지질들에 넣어준 뒤 드라이아이스에탄올에서 5분간 얼리고 상온에서 20–25분간 녹이는 과정을 5번 반복하였다. 그리고 여기에 0.05 M HEPES (pH 7.0) 용액을 넣어 총 부피를 500 μ L가 되도록 한 다음 소공의 크기가 400 nm, 200 nm 및 100 nm인 폴리탄산 에스텔막을 통과시켜 리포솜의 크기를 조절하였다. 리포솜 내에

봉입되지 않은 플라스미드 유전자는 DNase I (10 U), Exonuclease III (~30 U) 및 MgCl₂ (5 mM)를 넣어 37°C에서 1시간 동안 분해시켰고 이 반응은 20 mM EDTA를 첨가함으로써 종결하였다. 플라스미드 유전자가 봉입된 리포솜은 Sepharose CL-4B column (1.5×10 cm)을 통해 리포솜 내에 봉입되지 못하고 분해된 플라스미드 유전자로부터 분리하였다.¹²⁻¹⁴⁾

리포솜의 크기 측정

400 nm, 200 nm 혹은 100 nm의 소공 크기를 가지는 폴리탄산 에스텔막을 통과한 소량의 리포솜 분산액을 일정량의 3차 증류수로 희석한 뒤 제타전위계(380 ZLS, PSS-NICOM, USA)로 그 크기를 측정하였다.

결과 및 고찰

중성 지질인 POPC, 양성 지질인 DDAB, 음성 지질인 DSPE-PEG 2000 및 DSPE-PEG 2000-maleimide로 구성된 리포솜 내에 freeze/thawing 방법에 의해 플라스미드 유전자를 봉입할 수 있었다. Sepharose CL-4B column 크로마토그래피 결과, 플라스미드 유전자를 함유한 리포솜은 첫 번째 피크를 나타내었고 리포솜 밖에서 분해된 유전자는 두 번째 피크를 나타내었다(Figure 1). Sepharose CL-4B의 경우 크기에 따라 배출되는 속도가 다르므로 유전자를 함유한 리포솜이 먼저 배출되었고, 분해되어 그 크기가 작아진 유전자가 나중에 배출됨으로써 두 그룹의 분리가 가능하였다.^{12,13)}

리포솜 내로 플라스미드 유전자가 봉입되는데 영향을 미

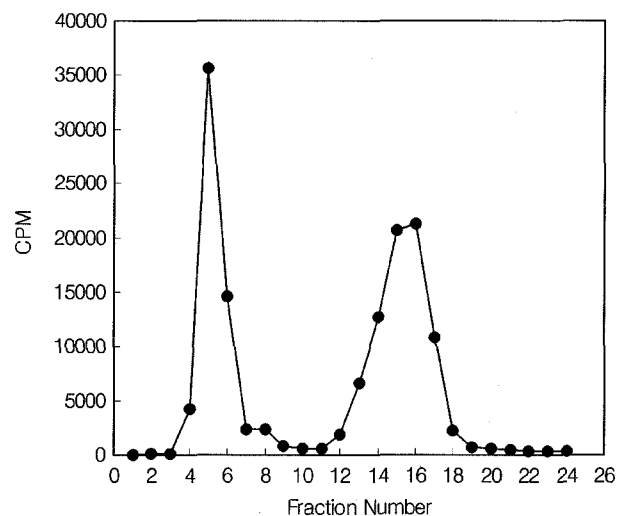


Figure 1—Sepharose CL-4B gel filtration chromatography. The first peak represents plasmid DNA entrapped in the pegylated liposome while the second peak represents the exteriorized nuclease-digested plasmid DNA.

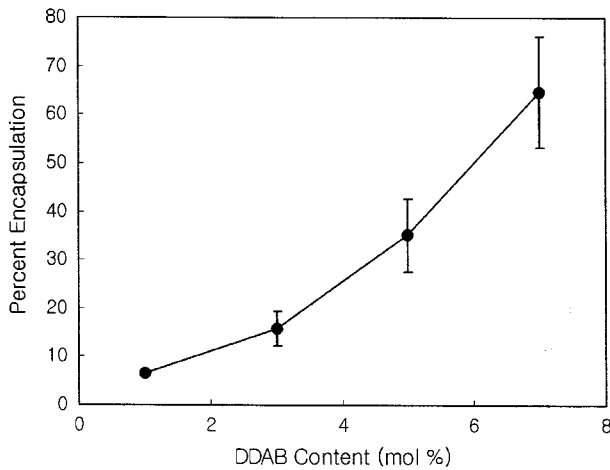


Figure 2—Effect of cationic lipid concentration on DNA encapsulation efficiency. Plasmid DNA (100 µg) and ³²P-DNA (1 µCi) were entrapped in the liposomes composed of POPC, DDAB, DSPE-PEG 2000 and DSPE-PEG 2000-maleimide. Each data point represents the mean±S.D. from triplicate experiments.

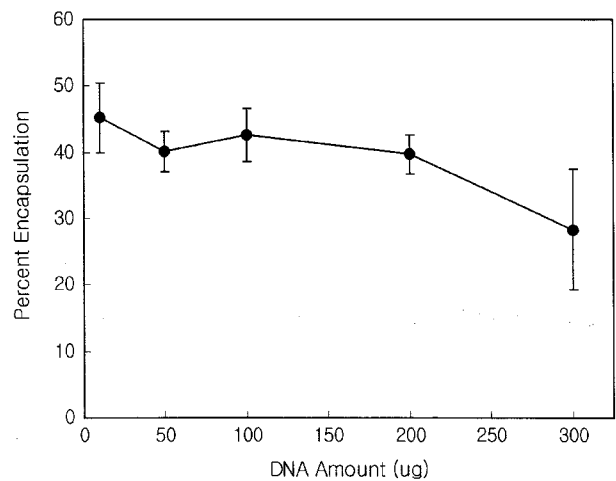


Figure 3—Effect of DNA amount on DNA encapsulation efficiency. The liposomes were composed of 92 mole% POPC, 4 mole% DDAB, 3 mole% DSPE-PEG 2000 and 1 mole% DSPE-PEG 2000-maleimide. Each data point represents the mean±S.D. from triplicate experiments.

치는 인자들을 알아보기 위하여 먼저 양성 지질인 DDAB의 농도를 전체 지질 함량의 1 mole% (0.2 µmole), 3 mole% (0.6 µmole), 5 mole% (1.0 µmole) 또는 7 mole% (1.4 µmole)로 달리하여 리포솜 내로의 DNA 봉입률(encapsulation efficiency)을 조사하였다(Figure 2). 이 때, 사용된 지질의 총량을 20 µmole로 유지하기 위하여 양성 지질의 몰 비가 증가함에 따라 중성 지질인 POPC의 몰 비를 감소시켰고 플라스미드 유전자는 100 µg을 사용하였으며 소공의 크기가 400 nm, 200 nm 및 100 nm인 폴리탄산 에스텔막을 순서대로 통과시켜 유전자를 함유하는 리포솜을 제조하였다. DDAB의 농도가 2 mole%씩 증가함에 따라 리포솜 내로의 유전자 봉입률도 2배 이상 증가하였다. 이는 양성 지질인 DODAC (N,N-dioleoyl-N,N-dimethylammonium chloride)의 몰 비를 증가시켰을 때 SPLP (stabilized plasmid-lipid particles) 내에 pCMVLuc plasmid의 봉입이 증가하였다는 Saravolac 등¹⁵⁾의 결과에 상응하였다.

또 다른 인자로는 플라스미드 유전자 양의 변화가 리포솜 내로의 유전자 봉입률에 미치는 영향을 조사하였다. 플라스미드 유전자의 양을 10 µg에서부터 300 µg까지 증가시킨 결과 200 µg까지는 리포솜 내로의 유전자 봉입률에 별다른 변화가 없었으나 유전자의 양이 그 이상으로 증가되었을 때는 리포솜 내 유전자 봉입률이 감소하였다(Figure 3). 이 때 지질의 총량은 20 µmole (92 mole% POPC, 4 mole% DDAB, 3 mole% DSPE-PEG 2000 및 1 mole% DSPE-PEG 2000-maleimide)이었으며 소공의 크기가 400 nm, 200 nm 및 100 nm인 폴리탄산 에스텔막을 통과시켜 유전자를 함유하는

중성 리포솜을 제조하였다. Monnard 등¹⁴⁾에 의하면 플라스미드 유전자의 양을 0.8 µg에서부터 100 µg까지 증가시켰을 때 POPC/DDAB로 구성된 리포솜 내 유전자 봉입률에는 유의적인 차이가 없었고, Saravolac 등¹⁵⁾은 100 µg-1000 µg 범위에서 유전자의 양이 증가함에 따라 DODAC/DOPE/PEG-CerC₈으로 구성된 리포솜 내로의 유전자 봉입률이 감소함을 보고하였다. 사용된 지질의 종류가 다르기는 하지만 두 그룹의 연구 결과를 통해 일정량의 지질로 구성된 리포솜 내에 봉입될 수 있는 유전자의 양에는 한계가 있음을 알 수 있었으며 이는 본 저자의 연구 결과와도 부합되었다.

리포솜의 크기가 리포솜 내로의 플라스미드 유전자 봉입률에 미치는 영향을 조사하기 위하여 지질의 총량은 20 µmole (92 mole% POPC, 4 mole% DDAB, 3 mole% DSPE-PEG 2000 및 1 mole% DSPE-PEG 2000-maleimide)로 유지하고 플라스미드 유전자는 100 µg을 사용하였다. 플라스미드 유전자를 함유한 중성 리포솜을 소공의 크기가 각각 400 nm, 200 nm 혹은 100 nm인 폴리탄산 에스텔막을 통해 그 크기를 조절한 후 제타전위계(380 ZLS, PSS-NICOM, USA)로 리포솜의 크기를 측정하였다. 소공의 크기가 400 nm인 폴리탄산 에스텔막을 통과한 리포솜은 그 크기가 1192±56 nm에서 190±2.9 nm로 현저히 감소되었으며 소공의 크기가 200 nm 및 100 nm인 폴리탄산 에스텔막을 통과한 리포솜의 크기는 각각 154±2.9 nm 및 115±3.4 nm로 폴리탄산 에스텔막의 소공 크기가 감소할수록 제조된 리포솜의 크기도 감소하였다. 리포솜 내로 봉입되는 유전자의 양은 리포솜의 크기가 증가함에 따라 소폭 증가하는 경향을 보였으나 유의적인

Table I—Liposome Size and DNA Amount Encapsulated into the Liposomes after Extrusion through Polycarbonate Filters with Pore Size of 400 nm, 200 nm or 100 nm

Pore size of polycarbonate filters	100 nm	200 nm	400 nm
Liposome size (nm)	115.0±3.4	154.0±2.9	190.0±2.9
DNA amount encapsulated (µg/mole lipid)	1.16±0.03	1.28±0.25	1.32±0.34

Values are presented as mean±S.D. (n = 3)

차이를 보이지는 않았다(Table I). 이 결과로 소공의 크기가 400 nm, 200 nm 및 100 nm인 폴리탄산 에스텔막을 통과하는 과정이 일정한 크기의 리포솜을 제조하는데 중요함을 알 수 있었고 폴리탄산 에스텔막의 소공 크기를 달리함으로써 원하는 크기의 리포솜을 제조할 수 있을 것으로 사료된다.

현재 tissue-specific promoter 혹은 tumor (cancer)-specific promoter들을 함유하는 플라스미드 유전자는 선택적으로 특정 생체 기관이나 종양(암)에서 발현하는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾ 이와 같은 유전자들을 유전자 전달 시스템을 통해 원하는 특정 기관이나 암으로 수송함으로써 그 기관에서 발병하는 여러 가지 질병이나 암을 선택적으로 치료하는데 사용될 수 있으리라 기대된다. Antisense oligonucleotides, ribozymes 및 DNazymes 등은 유전자 발현을 선택적으로 억제하거나 조절할 수 있으므로¹⁷⁻²¹⁾ 여러 가지 유전적인 질병을 치료하는데 사용될 수 있으며 이들을 원하는 부위에 전달하기 위해서 유전자 전달 시스템을 이용하는 것이 또한 가능하리라 사료된다. 다양한 유전자들을 원하는 부위로 전달하여 그곳에서 유전 형질을 발현하게 함으로써 여러 가지 질병의 보다 선택적이고 근본적인 치료를 유도할 수 있다는 점에서 이와 같은 유전자 전달 시스템의 개발은 중요하리라 사료된다.

본 연구에서는 양성, 중성 및 음성 지질들로 구성된 리포솜 내에 플라스미드 유전자를 봉입함으로써 생체 내에 편재해 있는 endonuclease들로부터 유전자를 보호할 수 있고 리포솜 표면에 존재하는 PEG를 통해 혈 중에서의 리포솜의 안정성 및 체류 시간을 증가시킬 수 있는 유전자 전달 시스템을 제조하였다. 또한, 리포솜 내에 플라스미드 유전자를 봉입하는데 영향을 미치는 여러 인자들에 대해 알아보았다. 앞으로 유전자를 선택적으로 원하는 세포로만 전달하기 위해 플라스미드 유전자를 함유한 리포솜의 끝 부분(DSPE-PEG 2000-maleimide)에 monoclonal antibody를 부착시켜 immunoliposome을 제조하고 그 특성에 관해 조사하고자 한다.

결 론

Freeze/thawing 방법에 의해 플라스미드 유전자를 리포솜

내에 봉입할 수 있었고 소공의 크기가 400 nm, 200 nm 및 100 nm인 폴리탄산 에스텔막을 통과시켜 리포솜의 크기를 일정하게 조절할 수 있었다. 양성 지질인 DDAB의 농도가 조금씩 증가함에 따라 리포솜 내 유전자의 봉입률은 상당히 증가하였다. 플라스미드 유전자의 양이 200 µg까지 증가했을 때는 리포솜 내로의 유전자 봉입률에 별다른 차이가 없었으나 그 이상으로 유전자의 양이 증가됨에 따라 리포솜 내 유전자 봉입률은 오히려 감소하였다. 폴리탄산 에스텔막의 소공 크기가 감소할수록 그 막을 통과한 리포솜의 크기 또한 감소하였으며 리포솜 내에 봉입된 유전자의 양은 소폭 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다.

감사의 말씀

본 연구는 한국학술진흥재단으로부터 2002년도 신진교수 연구과제(KRF-2002-003-E00200) 연구비를 지원 받아 수행 되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) E. Galanis, R. Vile and S.J. Russell, Delivery systems intended for *in vivo* gene therapy of cancer: targeting and replication competent viral vectors, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **38**, 177-192 (2001).
- 2) A.D. Miller, Retroviral vectors, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **158**, 1-24 (1992).
- 3) T.A. Smith, M.G. Mehaffey, D.B. Kayda, J.M. Saunders, S. Yei, B.C. Trapnell, A. McClelland and M. Kaleko, Adenovirus mediated expression of therapeutic plasma levels of human factor IX in mice, *Nature Genet.*, **5**, 397-402 (1993).
- 4) Y. Setoguchi, H.A. Jaffe, C.-S. Chu and R.G. Crystal, Intraperitoneal *in vivo* gene therapy to deliver alpha 1-antitrypsin to the systemic circulation, *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, **10**, 369-377 (1994).
- 5) Y. Yang, F.A. Nunes, K. Berencsi, E.E. Furth, E. Gonczol and J.M. Wilson, Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4407-4411 (1995).
- 6) Y. Yang, Q. Li, H.C.J. Erte and J.M. Wilson, Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses, *J. Virol.*, **69**, 2004-2015 (1995).
- 7) D.H. Hamer and P. Leder, Splicing and the formation of stable RNA, *Cell*, **18**, 1299-1302 (1979).
- 8) R.C. Mulligan, B.H. Howard and P. Berg, Synthesis of rabbit beta-globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 beta-globin recombinant genome, *Nature (London)*, **277**, 108-114 (1979).

- 9) S. Li and L. Huang, Nonviral gene therapy: promises and challenges, *Gene Ther.*, **7**, 31-34 (2000).
- 10) A.G. Schatzlein, Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress, *Anti-Cancer Drugs*, **12**, 275-304 (2001).
- 11) J. Smith, Y. Zhang and R. Niven, Toward development of a non-viral gene therapeutic, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **26**, 135-150 (1997).
- 12) N. Shi and W.M. Pardridge, Noninvasive gene targeting to the brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7567-7572 (2000).
- 13) J. Huwyler, W. Dafang and W.M. Pardridge, Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14164-14169 (1996).
- 14) P-A. Monnard, T. Oberholzer and P.L. Luisi, Entrapment of nucleic acids in liposomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1329**, 39-50 (1997).
- 15) E.G. Sarabolac, O. Ludkovski, R. Skirrow, M. Ossanlou, Y.P. Zhang, C. Giebrecht, J. Thompson, S. Thomas, H. Stark, P.R. Cullis and P. Scherrer, Encapsulation of plasmid DNA in stabilized plasmid-lipid particles composed of different cationic lipid concentration for optimal transfection activity, *J. Drug Target.*, **7**, 423-437 (2000).
- 16) K.J. Harrington, E. Linardakis and R.G. Vile, Transcriptional control: an essential component of cancer gene therapy strategies, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **44**, 167-184 (2000).
- 17) S. Akhtar, M.D. Hughes, A. Khan, M. Bibby, M. Hussain, Q. Nawaz, J. Double and P. Sayyed, The delivery of antisense therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **44**, 3-21 (2000).
- 18) S. Akhtar and S. Agrawal, *In vivo* studies with antisense oligonucleotides, *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**, 12-18 (1997).
- 19) E.R. Kandimalla and S. Agrawal, Antisense Therapeutics: is it as simple as complementary base recognition, *Mol. Med. Today*, **6**, 72-81 (2000).
- 20) M. Sioud, Application of preformed hammerhead ribozymes in gene therapy of cancer, *Int. J. Mol. Med.*, **3**, 381-384 (1999).
- 21) D. Sen and C.R. Geyer, DNA enzymes, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 680-687 (1998).