

## A DPL (DNA/peptide/liposomes) Tripartite Complex Effective for Transfection in Serum

Young-Cheol Kim<sup>1</sup> and Jong-Gu Park<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup>WeiGENE Inc., 71B-4L, Hightech Sector 2, Sungseo Industrial Park 3, Dalseogu, Daegu 704-230, Korea,

<sup>2</sup>Department of Medical Genetic Engineering, Keimyung University School of Medicine, Dongsan Medical Center, 194 Dongsandong, Joonggu, Daegu 700-712, Korea

A short peptide corresponding to the nuclear localization signal (NLS) of human immunodeficiency virus (HIV)-1 Tat protein, Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg, was employed to improve the efficiency of cellular uptake of nucleic acids. The peptide was first mixed with a reporter plasmid and then with cationic liposomes to form a tripartite complex of DNA/peptide/liposomes (DPL). Transfection efficiency of the DPL complex was compared with that of the conventional DNA/liposomes (DL) complex. When the DPL complex was formed with various cationic liposomes, DOTAP/DOPE (DP) liposome exhibited superior transfection efficiency to other liposomes tested *in vitro*. With the inclusion of the peptide, the DPL complex showed much enhanced transfection in various cancer cell lines. Particularly, transfection of the DPL complex in serum increased cellular uptake of a transgene up to 2 fold when compared with that in a serum free condition. Further, when the DPL complex was infused through the ureteric route of a rat, transfection efficiency was shown to be better in reporter gene expression than that obtained with the DL complex. This study shows that the DPL complex that is easy to formulate can be employed for much enhanced cellular uptake of a transgene.

**Key Words:** Tat peptide, Liposomes, Transfection, DPL Trimeric complex

### 서 론

최근 유전자 치료 및 분자생물학 분야가 급속히 발전함에 따라, 핵산체들을 목적 세포 및 조직에 보다 효율적으로 전달할 수 있는 기술들이 개발되고 있다 (Akhtar et al., 2000; Garcia-Chaumont et al., 2000; Lebedeva et al., 2000; Luo and Saltzman, 2000; Pouton and Seymour, 2001). 핵산체 전달 기술로서 유용성을 가지기 위해서는 세포 또는 조직에 충분한 양의 핵산체를 전달할 수 있어야 한다. 동시에, 핵산체의 전달로 인해 발생하는 세포 독성 및 면역반응을 최소화할 수 있어야 한다. 또한 유전자 치료 등의 임상적 응용을 위해서는 전달체 (vector)의 대량 생산이 가능하여야 한다. 핵산체 전달법은 크게 바이러스성과 비바이러스성 방법으로 나뉘어진다. 바이러스성 핵산체 전달법 (virus-mediated gene delivery)은 retrovirus, adenovirus 및 adeno-associated virus 등을 광범

위하게 이용한다. 그러나, 바이러스 벡터를 이용한 핵산체 전달 방법은 핵산 치료제의 활용 범위에 있어 제한을 받는다. 세포주에 대한 특이성 저하와 다양한 세포주에 대한 광범위한 적용이 어렵고, 다량 및 반복적인 투여는 면역반응을 일으키는 등 부작용이 보고 되고 있다 (Douglas and Curie, 1997; During, 1997; Wang and Huang, 2000). 비바이러스성 핵산체 전달 (non-viral gene delivery)을 위해서는 지질 (lipids), 리포솜 (liposomes), 폴리머 (polymers), 펩타이드 (peptides), electroporation, microinjection 등의 다양한 전달체 및 실험법들을 활용하고 있다. 이러한 전달체들은 쉽게 대량 생산될 수 있고, 핵산체와의 복합체 형성이 용이하며, 독성 및 면역반응 유발을 최소화할 수 있다. 이러한 이유로 최근에는 비바이러스성 핵산체 전달법의 연구개발을 보다 활발히 진행하고 있다.

지금까지 개발된 비바이러스성 핵산 전달체 중 가장 보편적으로 이용되고 있는 것은 양이온성 리포솜이다. 이들은 높은 전달 효율성을 나타내며, 간편하게 사용될 수 있어 상용화가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 양이온성 리포솜은 *in vitro*에서는 핵산체를 효율적으로 전달하지만 *in vivo*에서는 바이러스성 전달체에 비해 한계점을 가진다. 전달 효율성 측면에서도 핵산체의 크기, 혈청 (serum)의 존재유무, 사용 세

\*논문 접수: 2004년 5월 17일

수정재접수: 2004년 6월 30일

†교신저자: 박종구, (우) 700-712 대구광역시 중구 동산동 194 동산의료원 내 계명대학교 의과대학 의학유전공학교실  
Tel: 053-250-7854, Fax: 053-250-7854  
e-mail: jonggu@kmu.ac.kr

포주의 종류에 따라 영향을 받는다.

최근, 주로 염기성 아미노산들로 구성된 펩타이드들이 단백질 및 핵산체의 세포내 전달에 효율적임이 입증되고 있다. 이들은 HIV-1 Tat 단백질 (Ruben et al., 1989; Fawell et al., 1994; Vives et al., 1997; Schwarze et al., 1999; Fridler et al., 2000; Morris et al., 2000; Schwarze et al., 2000; Schwarze and Zhang, 2000; Eguchi et al., 2001; Futaki et al., 2001; Torchilin et al., 2001), SV40 large T antigen (Zanta et al., 1999), *Drosophila Antennapedia* (Ludtke et al., 1999), protamine sulfate (Derossi et al., 1996; Birchall et al., 2000), 그리고 Histone H1 (Dokka et al., 2000; Bharath et al., 2002) 등에서 유래한 것들이며, 이 중 HIV-1 Tat 단백질 자체 또는 Tat 펩타이드에 대한 연구가 가장 활발히 진행되고 있다. HIV-1 Tat 단백질은 2개의 exon으로 암호화된 86개의 아미노산 잔기들로 구성되어 있다. 핵내전이 신호 (nuclear localization signal, NLS)를 함유하는 아미노산 서열 1~72는 exon 1에 의해, 73~86은 exon 2에 의해 암호화되어 있다. NLS 서열은 2개의 lysine과 6개의 arginine 잔기들로 구성되며 고분자들의 세포내 전달을 촉진하는 것으로 알려져 있다. Tat 단백질의 protein transduction domain (PTD)은 disulfide (S-S) 결합에 의한 화학적 융합체, 또는 PTD 서열을 함유하는 융합 단백질의 형태로써 세포내 전달 연구에 활용되어 왔다.

본 연구에서는 효율적인 핵산 전달체로서 HIV-1 Tat 단백질 유래 펩타이드의 유용성을 조사하였다. 이를 위하여, Tat 펩타이드를 단순히 DNA 및 리포솜과 혼합한 DPL 복합체를 형성한 후 *in vitro* 및 *in vivo*에서의 전달 효율을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Reporter 유전자를 함유하는 재조합 plasmid의 구축

DNA/펩타이드/리포솜 (DPL) 복합체에 의한 핵산체의 세포내 전달 효율을 확인하기 위하여 2종류의 reporter 유전자 (luciferase,  $\beta$ -galactosidase)를 함유하는 재조합 plasmid를 구축하였다. pGEM-luc plasmid (Promega, USA) 유래의 luciferase 유전자 및 pHook-2 LacZ plasmid (Invitrogen, USA) 유래의  $\beta$ -galactosidase (LacZ) 유전자를 각각 pcDNA3 plasmid (Invitrogen, USA)의 BamHI-XhoI 및 HindIII-BamHI 부위에 cloning하였다. 구축한 재조합 plasmid들을 각각 pcDNA3-luc 및 pcDNA3-LacZ로 명명하였다.

### 2. 양이온성 리포솜

본 연구실에서 제작한 DOTAP-DOPE (DP) 리포솜 및 상품화된 리포솜들을 사용하여 복합체를 형성한 후 핵산체 전달 효율을 비교 분석하였다. DP 리포솜의 제작을 위해, CHCl<sub>3</sub>에 녹아 있는 50 mg/ml의 DOTAP (N'-1-(2,3-dioleoyloxy

propyl)-N'-N'-trimethylammoniummethyl sulphate; Avanti Polar Lipids, USA)과 50 mg/ml의 DOPE (Dioleoylphosphatidyl-ethanolamine, Avanti Polar Lipids, USA)를 1:1 (w/w)로 혼합한 다음, 증발기로 필름을 형성한 후 건조하였다. 건조된 지질 필름을 10 ml의 0.15 M 생리식염수로 용해함으로써 리포솜을 형성하였다. 상기의 리포솜을 vortex mixer로 혼합한 후 sonicator로 균질화하고, 100 nm의 직경을 가지는 Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids, USA)에 10회 통과하여 조제하였다. Lipofectin (LF: DOTMA/DOPE), Lipofectamine (LFA), Oligofectin (OP), DMRIE-C (DMC), Lipofectamine Plus (LFAP), Lipofectamine 2000 (LFAMi) 등의 양이온성 리포솜들은 시판하는 Invitrogen 사 (USA)의 것을 사용하였다.

### 3. DPL (DNA/펩타이드/리포솜) 복합체의 형성

개선된 핵산체 전달 효율을 얻기 위하여, plasmid DNA를 Tat 펩타이드 및 양이온성 리포솜과 다양한 비율로 혼합하였다. DPL (DNA/펩타이드/리포솜) 및 기존의 DL (DNA/리포솜) 복합체들을 Opti-MEM 배지 (Invitrogen, USA) 속에서 형성하였다. 복합체의 형성을 위하여, 공통적으로 0.3  $\mu$ g/50  $\mu$ l의 DNA를 다양한 양의 펩타이드 및 양이온성 리포솜과 혼합하였다. 한편, DPL 복합체를 구성하는 세 가지 성분의 혼합 순서가 전달 효율에 어떠한 영향을 미치는지도 조사하였다. 혼합은 (Tat 펩타이드 + DP 리포솜) + DNA, (DNA + Tat 펩타이드) + DP 리포솜, 그리고 (DNA + DP 리포솜) + Tat 펩타이드의 순서 등 세 가지의 경우로 하였다. 먼저, 50  $\mu$ l의 Opti-MEM으로 희석한 첫 번째 구성성분을 두 번째의 것과 혼합한 후 상온에서 10분간 반응하였다. 이 혼합체를 세 번째 구성성분을 함유하는 50  $\mu$ l의 Opti-MEM과 다시 혼합하여 10분간 반응한 다음 목적 세포주 및 랫트에 처리하였다.

### 4. DPL 복합체의 형질감염 (transfection)

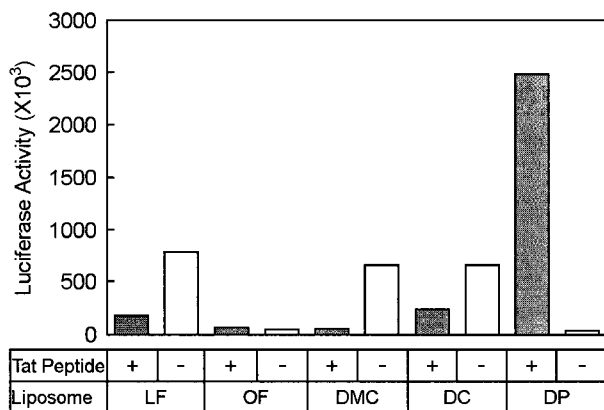
접착성 세포주 (adherent cell line)들의 경우, 형질감염 하루 전날 세포수가  $2 \times 10^5$  개/ml이 되도록 조정된 후 150~200  $\mu$ l의 배양 배지로 48-웰 플레이트에 분주하였다. 세포수의 조정에는 Opti-MEM (Invitrogen, USA) 또는 10% FBS 함유 EMEM 배지 (JBI, Korea)를 사용하였다. 부유성 세포주 (suspension cell line)들의 경우, 형질감염 직전 세포수가  $5 \times 10^5$  개/ml이 되도록 조정된 후 48-웰 플레이트에 분주하였다. 세포수의 조정에는 Opti-MEM 또는 10% FBS 함유 RPMI 1640 배지 (JBI, Korea)를 사용하였다. 분주한 세포에 DPL 또는 DL 복합체들을 처리하여 37°C에서 5시간 동안 형질감염하였다. 이어 Opti-MEM 배지로 희석한 300  $\mu$ l의 20% FBS를 첨가하고 16시간 동안의 추가 배양을 한 후, reporter 유전자의 세포내 발현 수준을 측정하였다.

### 5. 세포 내 luciferase 유전자의 활성 측정

pcDNA3-luc plasmid를 형질감염한 세포에서의 luciferase 활성을 Luciferase Assay System kit (Promega, USA)으로 측정하였다. 세포들을 회수하여 PBS ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  미함유) 완충액으로 2번 세척하고, 100  $\mu$ l의 1 $\times$  CCLR (cell culture lysis reagent, 25 mM Tris-phosphate (pH 7.8), 2 mM DTT, 2 mM 1,2-diaminocyclohexane-N'N'N'-tetraacetic acid, 10% glycerol, 1% Triton X-100) 용액으로 용해하였다. 세포 용해물을 12,000g, 1분의 조건으로 원심분리한 후, 50  $\mu$ l의 상청액에 20  $\mu$ l의 luciferase assay reagent를 첨가하였다. Luciferase 활성은 Luminometer (Berthold Detection Systems, Germany)로 10초간 측정하였다.

### 6. *In vivo*에서의 핵산체 전달 및 $\beta$ -galactosidase 활성 측정

주령 6주의 수컷 Sprague-Dawley (SD) 랫트 (200~250 g)를 SLC 사 (Japan)에서 구입하여 사육하였다. 펜토바비탈 (5 mg/100 g 몸무게)을 백서의 복강으로 주사하여 마취하고, 복부를 절개하여 왼쪽 신장의 노관을 노출하였다. pcDNA3-LacZ plasmid와 함께 조제한 DPL 복합체를 24 gauge catheter를 사용하여 왼쪽 신장의 노관을 통해 주입하였다. 48시간 후, 랫트를 에테르 마취로 희생하여 신장을 적출하였다. 신장조직을 Electronic Cryotome (Shandon, United Kingdom)으로 10  $\mu$ m의 두께로 절편한 후, Poly-Prep (Sigma, USA) 슬라이드에 부착하였다. 절편 조직내의  $\beta$ -galactosidase의 활성을 측



DNA: Tat Peptide:Liposome (1:3:5)

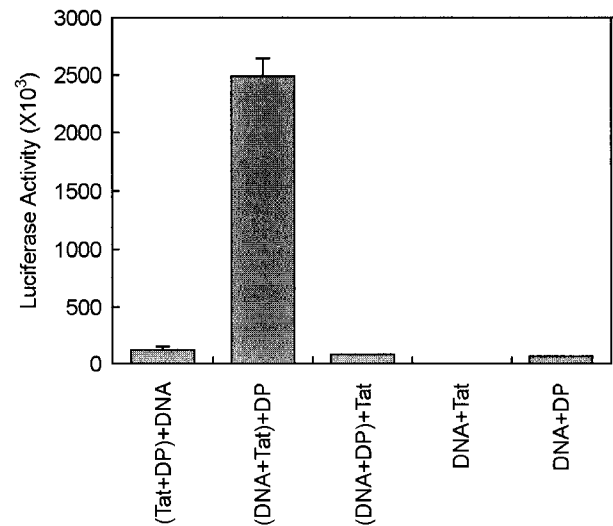
**Fig. 1.** Comparison of transfection efficiency among DPL complexes formed with different liposomes. The pcDNA3-luc plasmid (0.3  $\mu$ g) was mixed with various cationic liposomes with or without Tat peptide. After transfecting the DPL complexes to K562 cells, luciferase activities were measured for each treatment. \*Abbreviations: LF, Lipofectin; OF, Oligofectin; DMC, DMRIE-C; DC, DOTAP/ cholesterol; DP, DOTAP/DOPE.

정하기 위하여, 4% glutaraldehyde로 10분간 고정하고, 200  $\mu$ l의 X-gal 용액 (0.1 M sodium phosphate, 1 mM magnesium chloride, 150 mM sodium chloride, 1.5 mM potassium ferricyanide, 1.5 mM potassium ferrocyanide, 0.1% X-gal)으로 5%  $CO_2$  조건에서 16시간 동안 염색하였다. 조직을 hematoxylin으로 대조염색 (counter staining)한 후 광학 현미경 ( $\times 400$ )으로 관찰하였다.

## 결 과

### 1. DPL (DNA:펩타이드:리포솜) 복합체의 핵산체 전달 효율에 있어 리포솜의 영향

다양한 세포주 및 조직에 목적 핵산체를 효율적으로 전달할 수 있는 시스템을 개발하기 위하여, DNA 및 양이온성 리포솜에 HIV-1 Tat 단백질 유래의 펩타이드를 단순히 혼합하는 방법을 고안하였고, 이를 DPL 복합체로 명명하였다. 펩타이드로는 핵내 전이 신호 (NLS) 서열을 함유하는 12개의 아미노산 (49~60 위치: Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln) 잔기를 기본골격으로 가지는 Tat 펩타이드를 사용하였다. 리포솜의 종류가 핵산체 전달에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 5종류의 다른 양이온 리포솜을 동시에 사용하여 각각의 DPL 복합체를 형성한 후 K562 세포에 형질감염하였다. 이 때, 공통적으로 DNA (pcDNA3-luc) 및 Tat



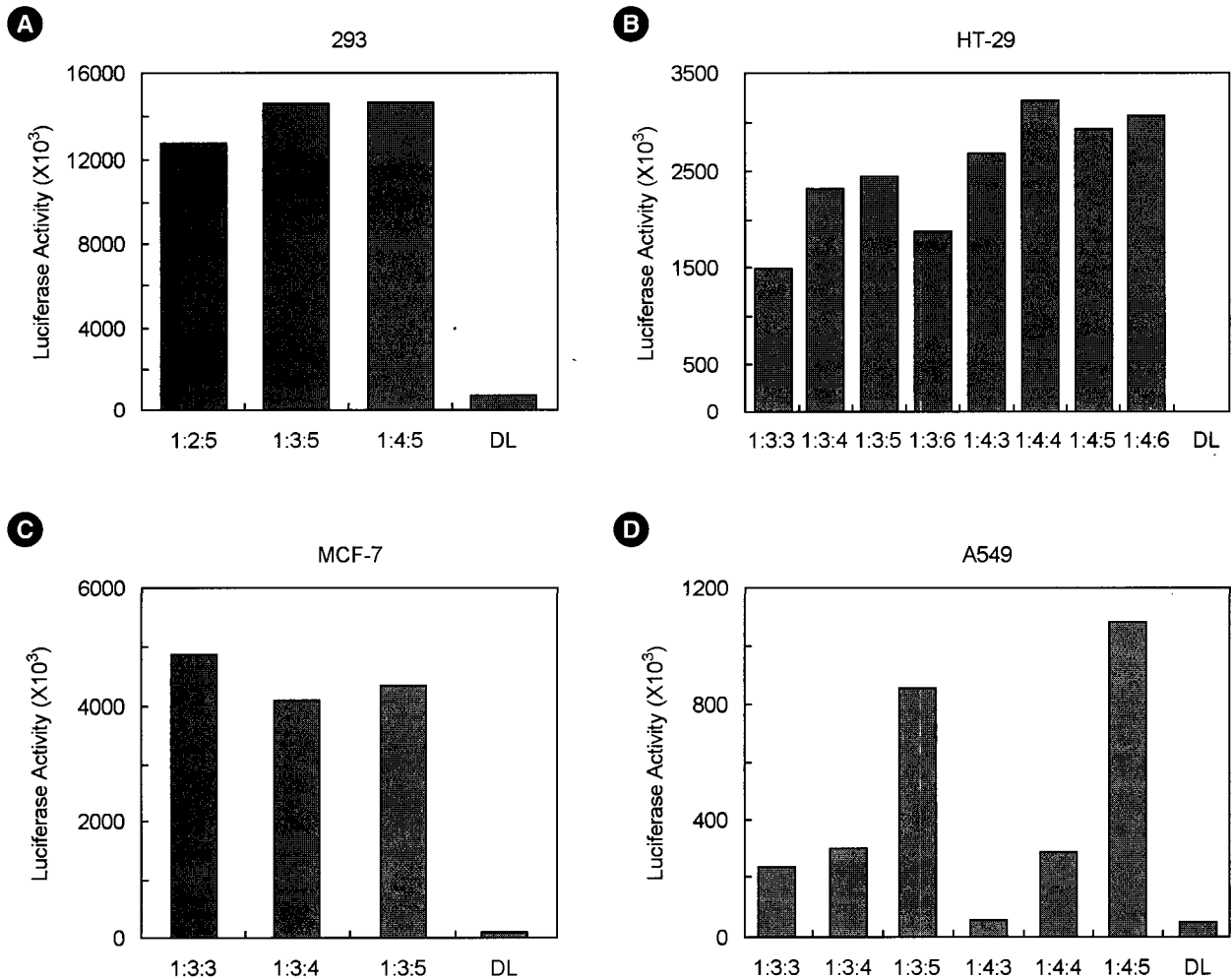
**Fig. 2.** Comparison of transfection efficiency by the order of addition of each component of DPL complexes. The three components of DPL complex, pcDNA3-luc plasmid, Tat peptide, and DP liposomes, were mixed in a ratio of 1:4:4 (w/w/w) as indicated various orders. After transfecting the complexes to K562 cells, luciferase activities were measured for each treatment. As controls, the plasmid DNA was mixed with Tat peptide or DP liposomes only, and assayed simultaneously. \*Abbreviations: Tat, Tat peptide; DP, DOTAP/DOPE liposomes

펩타이드를 먼저 혼합한 후, 리포솜을 첨가하여 복합체를 형성하였으며, 그 혼합비율은 1:3:5로 하였다. 대조군으로서 DNA를 리포솜으로만 혼합한 DL 복합체도 동시에 형질감염하였다. Luciferase 활성을 측정해 본 결과, DOTAP/DOPE (DP) 리포솜으로 형성한 DPL 복합체가 가장 높은 활성을 나타내며, 그 효율성은 DL 복합체에 비해 약 160배 증가함을 알 수 있었다. 반면에, Lipofectin (LF), Oligofectin (OF), DMRIE-C (DMC), 그리고 DOTAP-cholesterol (DC) 리포솜의 경우는 펩타이드와 함께 사용하였을 때 오히려 luciferase 활성이 감소되었다 (Fig. 1). 이 결과는 DOTAP/DOPE가 DPL 시스템에 있어 적합한 리포솜이라는 사실을 증명해 준다.

## 2. 혼합순서에 따른 DPL 복합체의 핵산체 전달 효율

DPL 복합체를 형성함에 있어 각 구성성분들 (DNA, Tat 펩

타이드, DP 리포솜)의 결합 순서가 핵산체 전달 효율에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여, 혼합은 공통적으로 D:P:L = 1:4:4 (w/w)의 비율로, 혼합순서는 (Tat 펩타이드 + DP 리포솜) + DNA, (DNA + Tat 펩타이드) + DP 리포솜, 그리고 (DNA + DP 리포솜) + Tat 펩타이드 등 세 가지의 경우로 하여 복합체를 형성한 후 K562 세포에 형질감염하였다. 그 결과, DNA를 펩타이드와 먼저 혼합한 후 리포솜을 나중에 첨가하는 경우가 가장 높은 luciferase 활성을 나타냄을 알 수 있었다 (Fig. 2). 반면에, 나머지 두 가지 경우의 혼합순서로 형성한 DPL 복합체들 및 DNA를 Tat 펩타이드 또는 DP 리포솜만으로 혼합한 복합체들은 상대적으로 낮은 luciferase 활성을 나타내었다. 이 결과로부터, DPL 복합체의 형성에 있어 각 구성성분들의 혼합 순서가 핵산체의 전달 효율성에 영향을 미친다는 사실을 확인할 수 있었다.



**Fig. 3.** Transfection efficiency of the DPL complexes in different human cells. The pcDNA3-luc plasmid (0.3  $\mu$ g) was mixed with Tat peptide and DP liposome in a various ratio as indicated and added to 293 (A), HT-29 (B), MCF-7 (C) and A549 (D) cells, respectively. After transfecting the DPL complexes to each cell line, luciferase activities were measured for each treatment. As controls, the plasmid DNA was complexed with DP liposomes only and assayed simultaneously. \*Abbreviations: DL, DL complexes

### 3. 다양한 세포주에 대한 DPL 복합체의 핵산체 전달 효율

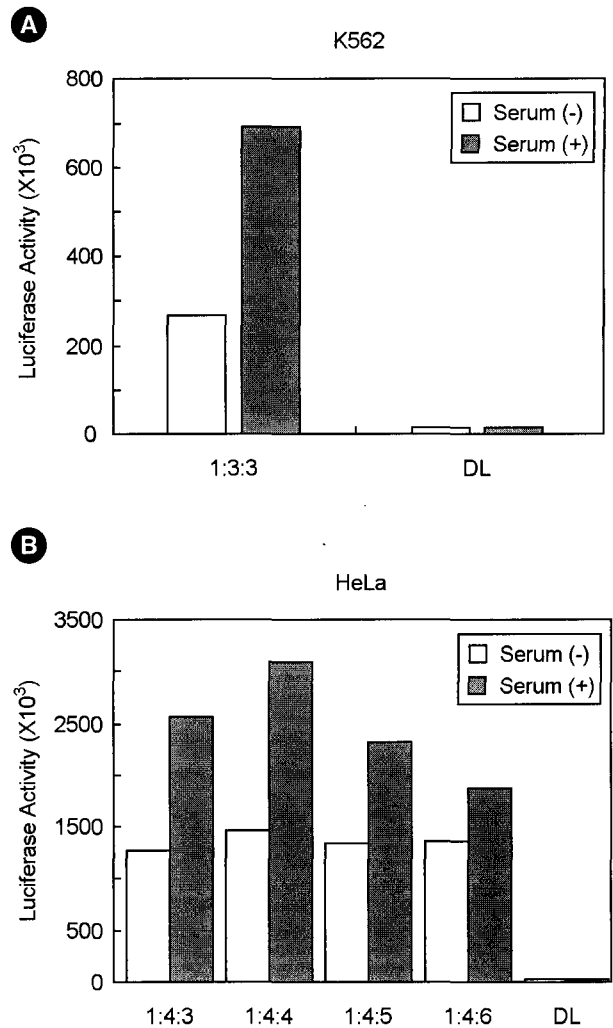
DPL 복합체가 시험한 K562 이외의 다른 세포주들에 대해서도 폭 넓게 응용될 수 있는지를 조사하기 위하여, 동일한 0.3  $\mu\text{g}$ 의 pcDNA3-luc plasmid에 Tat 펩타이드와 DP 리포솜을 다양한 비율로 혼합하여 복합체를 형성한 후 4종류 (293, HT-29, MCF-7, A549)의 세포주에 형질감염해 보았다. 이때 대조군으로서, DL 복합체를 세포에 동시에 처리한 후 luciferase 활성을 측정하였다. 예상한 바와 같이, DPL 복합체는 그 혼합 비율에 따라 세포주별로 다양한 전달 효율을 나타내었다 (Fig. 3). 그러나, DPL 복합체는 시험한 모든 세포주에 대하여 DL 복합체에 비해 약 30~200배 이상의 증가된 luciferase 활성을 보여주었다. 이러한 결과들은 본 연구를 통하여 고안한 DPL 복합체가 다양한 세포주들에 대한 범용성을 가진다는 사실을 증명해 준다.

### 4. DPL 복합체의 핵산체 전달 효율에 있어 혈청 (serum)의 영향

지금까지 대다수의 양이온성 리포솜들은 혈청이 존재하는 조건에서는 낮은 핵산체 전달 효율을 가지는 것으로 알려져 왔다. 그 원인으로서는 양이온성 리포솜이 혈청에 존재하는 단백질 및 지질과 결합할 가능성이 높다는 점을 들 수 있다. 따라서, DPL 복합체의 핵산체 전달 효율에 있어 혈청이 미치는 영향을 조사해 보았다. 이를 위하여, 동일한 0.3  $\mu\text{g}$ 의 pcDNA3-luc plasmid를 Tat 펩타이드 및 DP 리포솜과 다양한 비율로 혼합한 후 K562 및 HeLa 세포주에 형질감염하였다. 이 때, 대조군으로서 DP 리포솜만을 동시에 세포에 처리하였고, 배양배지로서는 10% FBS를 함유하는 것을 사용하였다. 또한, 혈청의 영향을 비교하기 위하여, FBS를 함유하지 않은 배지로 형질감염한 대조군도 동시에 분석하였다. 그 결과, FBS(+) 조건에서 형질감염한 DPL 복합체는 FBS(-) 조건에 비해 HeLa 및 K562 세포주 모두에서 최소 약 50% 이상의 증가된 luciferase 활성을 보여주었다 (Fig. 4). 이러한 결과들은 DPL 복합체가 기존의 리포솜에 비해 혈청이 존재하는 조건에서 보다 높은 효율로서 핵산체를 전달할 수 있음을 증명해 주었다. 특히, 무혈청 배양액에서 안정성이 떨어지는 세포나 *in vivo*에서의 핵산체 전달에 DPL 복합체가 효율적으로 응용될 수 있음을 예측할 수 있었다.

### 5. DPL 복합체의 *in vivo*에서의 핵산체 전달 효율

DPL 복합체가 혈청이 존재하는 *in vivo* 조건에서도 핵산체를 효율적으로 전달할 수 있는지를 확인하였다. 이를 위하여, 5  $\mu\text{g}$ 의 pcDNA3-LacZ plasmid를 Tat 펩타이드 및 DP 리포솜과 1:4:4의 비율로 혼합한 후 랫트의 신노관을 통해 주사하였다. 동결절편한 신장조직의  $\beta$ -galactosidase 활성을 X-



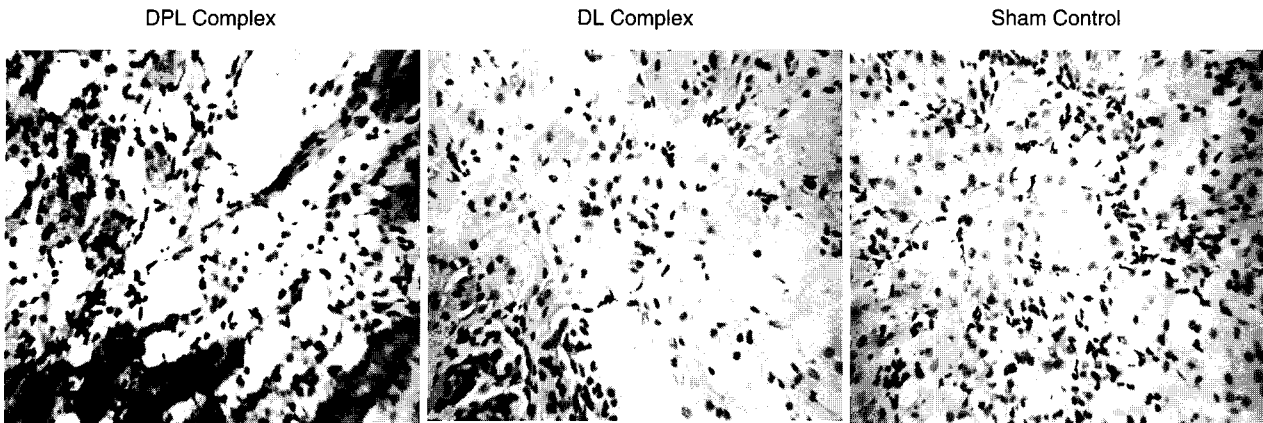
**Fig. 4.** Transfection efficiency of the DPL complexes *in serum*. The pcDNA3-luc plasmid (0.3  $\mu\text{g}$ ) was mixed with Tat peptide and DP liposomes in a various ratio as indicated and added to K562 (A) and HeLa (B) cells, respectively. After transfecting the DPL complexes to target cells in the 10% FBS(+) or FBS(-) condition, luciferase activities were measured for each treatment. As a control, the plasmid DNA was complexed with DP liposome only and assayed simultaneously.

\*Abbreviations: DL, DL complexes

gal 염색법으로 확인한 결과, 아무것도 처리하지 않았거나, plasmid DNA를 DP 리포솜만으로 혼합한 DL 복합체에 비해 DPL 복합체를 주사한 조직에서 높은 수준의 발현을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5). 이러한 결과들은 DPL 복합체가 혈청이 존재하는 *in vivo* 조건에서도 목적 핵산체를 효율적으로 전달할 수 있음을 증명해 준다.

## 고 찰

유전자 이상으로 발생하는 질환을 치료하거나 특정 유전



**Fig. 5.** Transfection efficiency of the DPL complex *in vivo*. The pcDNA3-LacZ plasmid (5 µg) was mixed with Tat peptide and DP liposomes in a ratio of 1:4:4 (w/w/w). The DPL complex was infused through ureteric route of SD rats. After 48 h, kidney was subtracted and subjected to frozen-section. 10 µm section was washed with PBS and fixed with 0.05% glutaraldehyde. Slides were immersed into X-gal solution for overnight and counterstained with hematoxylin. To compare the effects of the DPL complex on transfection efficiency, control section that is sham-injected or injected with DL complex was also prepared and assayed simultaneously (Magnification, 400×).

자의 기능을 밝히기 위한 연구를 위해서는 우선 안티센스 분자 등의 핵산체들을 목적 세포 및 조직에 효율적으로 전달할 수 있어야 한다. 지금까지 이를 위한 다양한 방법들이 개발되었으며, 그 중 양이온성 리포솜이 가장 보편적으로 이용되고 있다. 양이온성 리포솜은 대량 생산이 용이하고 편리하게 사용할 수 있으며, 전달 효율도 비교적 우수하기 때문이다. 그러나, 리포솜은 세포주에 따라 전달 효율의 변화가 심하며, 특히 혈청이 존재하는 조건에서는 그 효율이 급감하는 단점을 가진다. 따라서, 본 연구를 통하여 다양한 세포주에 대하여 목적 핵산체를 효율적으로 전달할 수 있을 뿐만 아니라, 혈청이 존재하는 조건에서도 우수한 전달 효율을 유지할 수 있는 시스템을 개발하고자 하였다. 이상적인 전달체로서의 펩타이드는 DNA를 응축 (condensation)할 수 있어야 하고, 조직 또는 세포 특이성이 있어야 하며, 세포막과의 융합 또는 파괴를 통하여 세포질을 거쳐 핵산체를 핵 안으로 전달할 수 있어야 한다. HIV-1 Tat 단백질은 핵산체를 응축하고 핵내로 전달할 수 있는 아미노산 서열을 가진다 (Schwarze et al., 2000).

본 연구를 통하여 DNA 및 DOTAP/DOPE (DP) 리포솜에 HIV-1 Tat 단백질 유래의 펩타이드를 단순히 혼합하는 DPL 복합체를 고안하였으며, 그 전달 효율성을 검증하기 위하여 다양한 암세포주 뿐만 아니라 *in vivo*에도 적용해 보았다. 시험한 양이온성 리포솜들 중 DOTAP/DOPE (DP) 리포솜으로 혼합한 DPL 복합체가 가장 높은 전달 효율성을 보여 주었다. DPL 복합체에 의한 핵산체의 효율적 전달은 Tat 펩타이드 및 DP 리포솜의 역할들이 상승효과를 일으키기 때문일 것이다. 즉, Tat 펩타이드에 의해 응축된 핵산체가 DOTAP의 세포막 융합으로 형성된 lysosome 형태로서 세포질로 들어

오면, fusogen 지질인 DOPE에 의해 세포질로 방출되고 이어 Tat 펩타이드의 기능에 의하여 핵내로 전달될 것이다. DNA와 펩타이드를 먼저 혼합한 후 리포솜을 첨가한 형태의 복합체가 가장 높은 전달 효율을 나타낸 본 연구의 결과도 이러한 추측을 강하게 뒷받침 해 준다. 한편, DPL 복합체를 구성하는 각 성분들의 최적 혼합비율은 세포주마다 다소 차이가 있는 것으로 밝혀졌다.

DPL 복합체의 활용으로서 얻은 가장 특징적인 결과는 이 복합체가 혈청이 존재하는 배양액상에서 오히려 핵산체의 전달 효율이 상승한다는 것이었다. 그 원인을 정확하게 분석하기는 어려우나, 이 결과는 DPL 복합체를 *in vivo*에도 효율적으로 적용할 수 있음을 암시해 주었다. 실제로 LacZ 유전자로서 DPL 복합체를 형성하여 팻트의 신장에 주입하였을 때, 신장조직 전반에 걸쳐 X-gal 염색이 일어남을 관찰할 수 있었다. 대다수의 양이온 리포솜은 혈청을 함유하는 배양액 조건에서는 낮은 핵산체 전달 효율을 보여 주었다. 전달 효율이 떨어지는 대표적 이유는 리포솜의 강한 양이온 전하가 혈청속에 존재하는 단백질 및 지질과의 응집을 통해 중성화됨으로써, 궁극적으로 세포막과의 결합 및 융합이 어렵게 된다는 점을 들 수 있다. 이에 비해, DP 리포솜은 비교적 약한 양이온 성질을 가지므로, 혈청 단백질 및 지질과 상대적으로 약한 결합을 형성하고, 이러한 가역적인 약한 결합에 의해 양이온 성질을 유지할 수 있을 것으로 예상된다. 또한 혈청 내의 특정 지질 (phospholipid 등)이 DPL 복합체와 가역적으로 결합함으로써 상승 효과를 나타낼 수도 있을 것이다.

이상의 결과들을 바탕으로 DPL 복합체는 핵산체 전달에 있어 기존의 리포솜보다 높은 효율을 가지며, 단순히 혼합을

함으로써 쉽게 조절될 수 있고, 특히 혈청 내에서도 안정성을 가짐을 확인할 수 있었다. DPL 복합체는 *in vitro*에서의 핵산체 전달을 통한 다양한 기초연구 뿐만 아니라, 센스 및 안티센스 분자 등 다양한 유전자 치료제 개발을 위한 *in vivo* 연구에도 폭 넓게 활용될 수 있을 것이다. 향후, 보다 다양한 펩타이드 및 리포좀들을 조합하여 보다 개선된 효율성을 가지는 DPL 복합체의 추가 개발을 위한 연구도 후속적으로 진행되어야 할 것이다.

#### Acknowledgement

This study was supported by the CDRC grants of the Korean Science & Engineering Foundation (grant no. R01-2000-00138), Korean Ministry of Health and Wellbeing (grant no. 03-PJ4-PG11-VN01-SV02-0010) and WelGENE Inc., a biotechnology company founded by Dr. Jong-Gu Park.

#### REFERENCES

- Akhtar S, Hughes MD, Khan A, Bibby M, Hussain M, Nawaz Q, Double J, Sayyed P. The delivery of antisense therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000. 44: 3-21.
- Bharath MM, Chandra NR, Rao MR. Prediction of an HMG-box fold in the C-terminal domain of histone H1: insights into its role in DNA condensation. *Proteins.* 2002. 49: 71-81.
- Birchall JC, Kellaway IW, Gumbleton M. Physical stability and *in vitro* gene expression efficiency of nebulised lipid-peptide-DNA complexes. *Int J Pharm.* 2000. 197: 221-231.
- Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia Homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem.* 1996. 271: 18188-18193.
- Dokka S, Toledo D, Shi X, Ye J, Rojanasakul Y. High-efficiency gene transfection of macrophages by lipoplexes. *Int J Pharm.* 2000. 206: 97-104.
- Douglas JT, Curie DT. Adenoviruses as vectors for gene therapy. *Science & Medicine.* 1997. 1: 44-52.
- During MJ. Adeno-associated virus as a gene delivery system. *Advanced drug delivery reviews,* 1997. 27: 83-94.
- Eguchi A, Akuta T, Okuyama H, Senda T, Yokoi H, Inoguchi H, Fujita S, Hayakawa T, Takeda K, Hasegawa M, Nakanishi M. Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells. *J Biol Chem.* 2001. 276: 26204-26210.
- Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, Barsoum J. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1994. 91: 664-668.
- Fridler A, Friedler D, Luedtke NW, Tor Y, Loyter A, Gilon C. Development of a functional backbone cyclic mimetic of the HIV-1 Tat arginine-rich motif. *J Biol Chem.* 2002. 275: 23783-23789.
- Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K, Sugiura Y. Arginine-rich peptides. *J Biol Chem.* 2001. 276: 5836-5840.
- Garcia-Chaumont C, Seksek O, Grzybowska J, Borowski E, Bolard J. Delivery systems for antisense oligonucleotides. *Pharmacol Ther.* 2000. 76: 151-1601.
- Lebedeva I, Benimetskaya L, Stein CA, Vilenchik M. Cellular delivery of antisense oligonucleotides. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000. 50: 101-119.
- Ludtke JJ, Zhang G, Sebestyen MG, Wolff JA. A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1kb DNA. *J Cell Sci.* 1999. 112: 2033-2041.
- Luo D, Saltzman WM. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotech.* 2000. 18: 33-37.
- Morris MC, Chaloin L, Heitz F, Divita G. Translocation peptides and proteins and their use for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol.* 2000. 11: 461-466.
- Pouton CW, Seymour LW. Key issues in non-viral gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001. 46: 187-203.
- Ruben S, Perkins A, Purcell R, Joung K, Sia R, Burghoff R, Haseitine WA, Rosen CA. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol.* 1989. 63: 1-8.
- Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. *In vivo* protein transduction: Delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science.* 1999. 285: 1569-1572.
- Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF. Protein transduction: unrestricted delivery into the all cells? *Trends Cell Biol.* 2000. 10: 290-295.
- Schwarze JJ, Zhang S. Protein-mediated cellular delivery. *Curr Opin Mol Ther.* 2000. 2: 162-167.
- Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V, Levchenko TS. Tat peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 2001. 98: 8786-8791.
- Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem.* 1997. 272: 16010-16017.

Wang Y, Huang S. Adenovirus technology for gene manipulation and functional studies. *Drug Discov Today*. 2000. 5: 10-16.  
Zanta MA, Valladier PB, Behr JP. Gene delivery: A single nuclear

localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proc Natl Acad Sci*. 1999. 96: 91-96.