

사이토카인 유전자 함유 바이러스 유사입자의 제조

오유경[†] · 손태종 · 신광숙 · 강민정 · 김정목* · 김남근 · 고정재 · 김종국**

포천중문 의과대학교 *한양대학교 의과대학, **서울대학교 약학대학
(2001년 8월 3일 접수)

Virus-like Particles Containing Cytokine Plasmid DNA

Yu-Kyoung Oh[†], Tae-Jong Son, Kwang-Sook Sin, Min-Jeong Kang, Jung Mogg Kim*,
Nam Keun Kim, Jung Jae Ko and Chong-Kook Kim**

College of Medicine, Pochon CHA University, Pochon, Kyonggi-do 487-800, Korea

*College of Medicine and Biomedical Research Institute, Hanyang University, Seoul 133-861, Korea

**College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received August 3, 2001)

ABSTRACT—Human papillomavirus (HPV) infection is known to cause cervical cancers. Human papillomavirus-like particles (VLP) have been studied as preventive vaccines of cervical cancers. To develop VLP as a therapeutic gene carrier, we studied the method to encapsulate cytokine genes in virus-like particles. HPV type 16 capsid L1 genes were amplified by polymerase chain reaction and cloned into T vector. L1 gene was then inserted into baculovirus transfer vector. The clone of baculovirus encoding L1 gene was isolated and used to express L1 protein in Sf 21 insect cells. VLP were purified by CsCl density gradient and ultracentrifugation. VLP were disassembled to capsomer units by treatment of a reducing agent. Given that interleukin-2 (IL-2) genes have been used in anticancer gene therapy and as a molecular adjuvant, IL-2 cytokine plasmids were chosen as a model gene. IL-2 plasmids were incubated with the disassembled capsomer suspension. To reassemble the particles, the mixture of capsomers and cytokine plasmids was dialyzed. The disassembly and reassembly of VLP were confirmed by transmission electron microscopy. The entrapment of cytokine plasmids in reassembled VLP was tested by the stability of plasmids against DNase I. After treatment of reassembled virus-like particles with DNase I, discrete IL-2 DNA band was observed. Our results indicate that IL-2 cytokine plasmid (3.5 kb size) can be encapsulated in the virus-like particles, suggesting the potential of VLP as a gene delivery system. Moreover, VLP containing the adjuvant cytokine plasmids might function as more effective subunit vaccines.

Keywords—Virus-like particle, Gene delivery, Human papillomavirus, Cytokine plasmid

바이러스 유사 입자(virus-like particle)란 바이러스의 캡시드(capsid)를 구성하는 단위인 캡소머(capsomer) 단백질들이 조립(assembly)되어 형성된 입자를 지칭하는 것이다. 바이러스 유사 입자는 실제 바이러스와 표면 성질 및 세포 내로의 감염도가 유사한 성질이 있으나 그 내부에 바이러스의 핵산을 함유하지 않는 차이점이 있다. 바이러스 유사 입자가 체 내에서 바이러스와 유사한 분포 및 세포 내 수송을 나타내는 특징을 이용하여 바이러스 유사 입자를 바이러스 감염 예방용 백신으로서 응용하는 연구들이 수행되어 왔다¹⁾. 최근 들어, 바이러스 유사 입자는 *in vitro*에서 바이러스의 분리 배양이 어려운 인간 파필로마 바이러스(human papilloma-

virus, HPV)를 연구하는 데 있어서 자궁경부암 예방용 소단위(subunit) 백신으로의 활용 가능성이 제기되어 왔으나²⁾ 제분야의 수송체로서의 이용가능성에 대한 연구는 거의 수행된 바 없다.

HPV는 8개의 초기 유전자들(early genes)과 2개의 후기 유전자들(late genes)에 의해 코딩되는 크기가 작은(50 내지 60 nm) 비봉입성(nonenveloped), 20면체(icosahedral)의 DNA 바이러스이다. 바이러스 게놈의 L1 및 L2 유전자는 바이러스 캡시드 단백질을 암호화하고, 초기(E) 유전자들은 바이러스 복제 및 세포성 변형(cellular transformation) 등의 기능과 관련되어 있다. L1 단백질은 주요(major) 캡시드 단백질이고 55 내지 60 kDa의 분자량을 갖는다. L2 단백질은 분자량이 약 55 내지 60 kDa 정도로 추정되지만 실질적으로 폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel) 전기영동 상에서

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : (031)542-6671, E-mail : ohyk@hotmail.com

결정된 분자량은 75 내지 100 kDa에 달하는 부(minor) 캡시드 단백질이다. L1 및 L2 유전자들은 동물에서 HPV의 감염의 치료 및 예방을 위한 백신의 제조에 사용되어 왔다. 일례로, 재조합 HPV L1 단백질 또는 재조합 HPV L1과 HPV L2 단백질의 혼합물이 HPV 감염의 예방 및 치료를 위한 백신으로 연구되어 왔으며, HPV의 검출을 위한 항원으로도 사용될 수 있음이 보고되었다^{3,4)}. 그러나, 현재까지 HPV의 캡시드 단백질로부터 유래한 바이러스 유사 입자를 입자 내부에 목적하는 유전자를 봉입하여 유전자 수송체로 사용한 예는 아직까지 보고된 바 없다.

한편, 유전자 수송체 분야는 바이러스성 수송체(viral vector)와 비 바이러스성 수송체(non-viral vector)에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 현재까지 바이러스성 수송체로는 아데노바이러스(adenovirus)⁵⁾ 등이 많이 연구되고 있고 비 바이러스성 수송체로는 양이온성 리포솜(cationic liposome)이나^{6,7)} polyethylenimine 등의 양이온성 고분자^{8,9)} 등이 수송체 소재로 연구되고 있다. 그러나 기존의 유전자 수송체는 바이러스성 수송체일 경우에는 바이러스 자체가 소유하는 유전자에 의한 체내 안전성 문제가 제기되어 왔고, 비 바이러스성 수송체일 경우에는 세포 표면의 수용체를 통하여 효과적으로 수송되는 바이러스성 수송체에 비하여 체내 세포 내로의 수송 효율이 낮다는 문제점이 지적되어 왔다. 또한, 일반적으로 수송되는 유전자는 양이온성 리포솜 입자 등의 비 바이러스성 수송체 표면에 결합된 상태로 노출되어 존재하므로 체내 투여시 핵산 분해효소 등에 의하여 분해될 가능성이 매우 높아 다량으로 투여해야 하는 등의 단점이 있다.

이에 본 연구에서는 백신으로서 주로 연구되어온 바이러스 유사 입자의 분해 및 제조립 성질을 응용하여 목적하는 cytokine 유전자를 바이러스 유사 입자 내에 봉입하는 방법을 확립하여 바이러스 유사입자의 gene delivery system으로서의 새로운 이용 가능성을 평가하였다.

실험방법

HPV 유사 입자의 제조

파필로마 바이러스(human papillomavirus, HPV) 유사 입자를 제조하기 위하여, HPV 타입 16에 감염된 자궁경부암 임상 검체(분당 차병원에서 제공)에서 파필로마 바이러스의 캡시드 단백질 L1에 대한 유전자를 증합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 증폭하였다¹⁰⁾. HPV 16 캡시드 단백질 L1을 코딩하는 유전자를 증폭하기 위하여 센스 프라이머(sense primer)로 5'-ccagatctatgtctcttggctg

cctagtggagc-3'와 안티센스 프라이머(antisense primer)로 5'-ccagatctttacagcttacggttttgcgttag-3'를 사용하였다. 상기 프라이머 쌍은 HPV 16 캡시드 단백질 L1을 코딩하는 유전자의 염기서열 5638-7155 부위를 특이적으로 인식하도록 고안되었다.

PCR 증폭은 95°C에서 5분간 변성시킨 후 94°C에서 40초, 55°C에서 60초, 72°C에서 2분의 반응을 30회 반복 실시하였다. 이로부터 증폭된 약 1,500 bp의 DNA를 T-vector (Promega사)에 클로닝한 후 베콜로바이러스 전이 벡터(baculovirus transfer vector, Clontech사) 내에 삽입하여 HPV 16의 캡시드 단백질 L1 유전자를 함유하는 재조합 베콜로바이러스 전이 벡터를 제조하였다. 상기 재조합 베콜로바이러스의 전이 벡터를 선형(linear)의 베콜로바이러스 DNA와 함께 sf21 곤충 세포주(Clontech사, 미국)에 Bacfectin™ transfection reagent(Clontech사, 미국)를 이용하여 형질감염(transfection) 시킨 후 형성되는 바이러스의 플라크(plaque)들을 선택하여 sf21 곤충 세포주에서 증폭시키고 웨스턴 블롯(Western blot) 분석을 실시하여 HPV 16의 캡시드 단백질 L1을 발현하는 형질감염 세포주만을 선별하였다. 상기 형질감염 세포주를 4일간 HyQ Insect Media(Hyclone, USA)에서 배양하여 곤충세포 내에서 HPV 16의 캡시드 단백질 L1을 발현시켰다. 상기 곤충세포로부터 발현된 HPV 16의 캡시드 단백질 L1 유사 입자를 수득하기 위하여, 세포에 초음파 처리(sonication)를 하여 세포 파쇄물(lysate)을 얻은 후 이를 40% 수크로오스(sucrose)로 원심분리하여 침전물(pellet)을 분리하였다. 얻어진 침전물을 5 내지 40%의 CsCl 농도구배(gradient) 크로마토그래피에 로딩하고 21시간 동안 134,400 ×g에서 원심분리하였다. CsCl 농도구배 분획을 500 μ씩 각각 수득한 후 바이러스 유사 입자가 존재하는 분획을 확인하기 위하여 면역 블롯 분석(immunoblot)을 수행하였다 (Figure 1). 바이러스 유사 입자를 함유하는 분획을 인산염 완충용액에 투석한 후 센트리콘-30(Centricon-30, Millipore

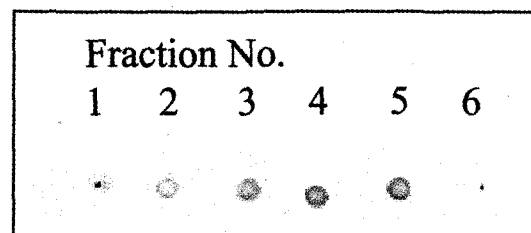


Figure 1—Immunoblot of VLP L1 proteins. After ultracentrifugation, each fraction (0.5 ml) was sequentially obtained. The fractions containing VLP L1 proteins were identified by immunoblots using a mouse monoclonal CamVir antibody and an anti-mouse IgG antibody conjugated with alkaline phosphatase.

사)을 이용하여 농축시킨 후 최종 농축액의 농도를 Micro BCA 키트(Pierce사)로 정량하였다.

쿠마시 염색과 웨스턴 블롯 분석

HPV 16 L1 캡시드 단백질 유전자가 재조합된 베콜로바이러스 전이 벡터로 형질감염된 곤충 세포주로부터 발현된 단백질이 목적하는 HPV 유사 입자 캡시드 단백질인지 확인하기 위하여 베콜로바이러스 전이 벡터가 형질감염되지 않은 곤충 세포주를 대조군으로 사용하여 쿠마시 염색과 웨스턴 블롯 분석(Western blot analysis)을 수행하였다. 웨스턴 블롯 분석을 위하여, HPV 16-L1 캡시드 단백질에 대한 항체로 CamVir 단클론 항체(RDI사)를 PBS-T(phosphate-buffered solution with 0.1% Tween 20)로 1:1000배 희석하여 사용하고 2차 항체로 알카라인 포스파타아제(alkaline phosphatase)가 결합된 항 마우스 IgG 항체(anti-mouse IgG antibody, Pierce사)를 1:2000배 희석하여 사용하였다.

전자 현미경 측정

투과 전자 현미경으로 바이러스 유사 입자가 제조된 것을 확인하기 위하여 바이러스 유사 입자 현탁액 약 2μl를 카본 코팅된 그리드 위에 적가하고 건조시킨 후 2%의 우라닐 아세테이트(uranyl acetate)로 염색한 뒤 투과 전자 현미경(transmission electron microscope)으로 165,000×배율에서 관찰하였다.

바이러스 유사 입자의 분해 및 재조립 조건

바이러스 유사 입자를 분해하기 위하여 바이러스 유사 입자 5μg을 환원제인 β-머캅토에탄올 5% 존재 하에서 30분 동안 반응시킨 후 전자 현미경으로 165,000×배율에서 관찰하였다. 또한 환원제 제거시의 재조립 여부를 확인하기 위하여 상기 단위 캡소머 단백질들을 5 mM CaCl₂가 존재하는 인산염 완충용액 하에서 24시간 동안 투석하여 환원제를 제거한 후 전자 현미경으로 165,000×배율에서 관찰하였다.

Cytokine 유전자 plasmid의 제조

바이러스 유사 입자 내부로 봉입될 유전자로 인터류킨-2(interleukin-2, IL-2) 유전자를 얻기 위하여, IL-2 유전자의 529 bp DNA 단편(포항공과대학교의 성영철 박사로부터 공급받음)을 pVAX 발현 벡터(Invitrogen사)의 다중 클로닝 부위(multicloning site) 내 Nhe I/Bam HI 제한효소 부위에 삽입하여 플라스미드 pVAX/IL-2를 제작한 후(Figure 2) 이를 대장균(*Escherichia coli*) DH5α에 형질전환하여 IL-2를 발현하는 형질전환 대장균을 선별하였다. 퀴아젠 메가 프랩

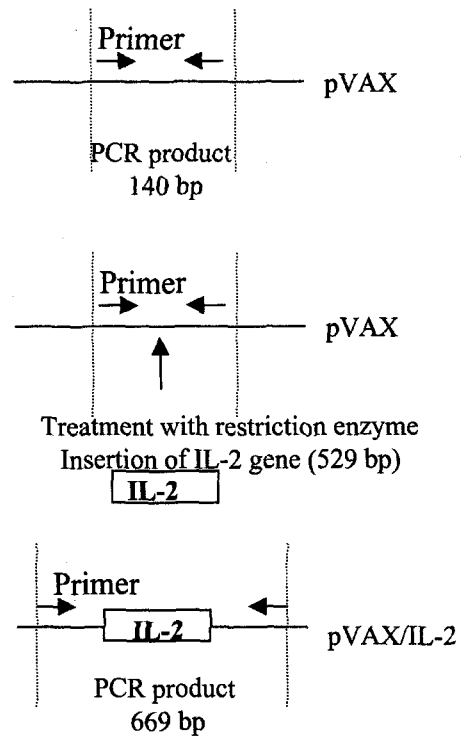


Figure 2—Construction scheme of pVAX/IL-2 plasmids. IL-2 gene was cut from pCIneoIL-2 using *Nhe* I and *Bam* HI restriction enzymes and inserted into the pVAX1 vector, in which the IL-2 gene expression was under the control of the CMV promoter. The plasmid DNA was amplified using *Escherichia coli* DH5α and purified using the Qiagen Giga Prep kit.

키트(Qiagen Mega Prep kit, Qiagen사)를 이용하여 상기 형질전환 대장균으로부터 pVAX/IL-2 플라스미드 DNA를 분리·정제하였다.

IL-2 유전자가 pVAX 벡터 내로 삽입되었는지 확인하기 위하여 상기에서 분리·정제된 pVAX/IL-2 플라스미드 DNA를 주형으로 하고 pVAX 벡터의 염기서열 668-689번 및 786-808번 부위를 각각 특이적으로 인식하는 센스 프라이머(서열 5'-acgactcactatagggagacc-3')와 안티센스 프라이머(서열 5'-caactagaaggcagctcgagg-3')를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. PCR 증폭은 94°C에서 5분간 변성시킨 후 95°C에서 40초, 56°C에서 30초, 72°C에서 30초의 반응을 33회 반복 실시한 후 72°C에서 5분간 추가로 반응시켰다.

바이러스 유사 입자의 분해 및 재조립을 통한 유전자 봉입

IL-2 plasmid 유전자를 바이러스 유사 입자 내로 봉입하기 위하여, 바이러스 유사 입자 5μg을 β-머캅토에탄올 5% 존재 하에서 30분 동안 반응시켜 완전히 단위 캡소머 단백질로 분해시킨 후 상기 캡소머 단백질에 pVAX/IL-2 유전자 5μg을 혼합하여 투석을 시작하였다. 대조군으로는 바이러스

유사 입자 없이 동량의 유전자를 함유하는 검체를 사용하였다. 상기 반응액을 5 mM CaCl₂가 첨가된 인산염 완충용액 하에서 투석하여 환원제로 사용된 β-머캅토에탄올을 완전히 제거한 후 DNase I 분해효소(Gibco BRL사)를 100 unit/ml 농도로 처리하여 바이러스 유사 입자 외부에 존재하는 미 봉입된 상태의 유전자를 제거하였다. 그 후 바이러스 유사 입자 내부로 IL-2 유전자가 봉입되었는지 확인하기 위하여 바이러스 유사 입자에 단백질 분해효소 프로테아제 K(protease K, Gibco BRL사)를 1 mg/ml 농도로 1시간 동안 처리하여 분해한 뒤 전기영동을 수행하여 나타나는 유전자의 DNA 밴드를 관찰하였다.

결과 및 고찰

바이러스 유사입자의 발현

베쿨로바이러스 전이 벡터가 형질감염되지 않은 대조군 곤충 세포주의 경우 쿠마시 염색 후(Figure 3, lane B) 웨스턴 블릿 시 HPV 16-L1 캡시드 단백질의 특징적인 분자량인 55 내지 60 kDa에서 단백질이 존재하지 않는 것이 확인되었다(Figure 3, 라인 D). 그러나, HPV 16-L1 캡시드 단백질 유전자를 함유하는 베쿨로바이러스 전이 벡터가 형질감염된 곤충 세포주에서는 웨스턴 블릿 분석시 HPV 16의 L1 캡시드 단백질의 특징적인 분자량에 해당하는 58

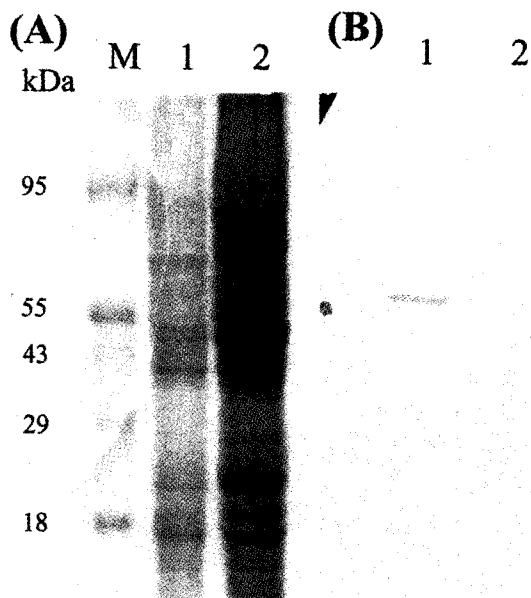


Figure 3—Coomassie staining and Western blot. M: molecular weight marker; A) Recombinant baculovirus-infected sf21 cell/Coomassie staining; B) Uninfected sf21 cell/Coomassie staining; C) Recombinant baculovirus-infected sf21 cell/Western blot; D) Uninfected sf21 cell/ Western blot

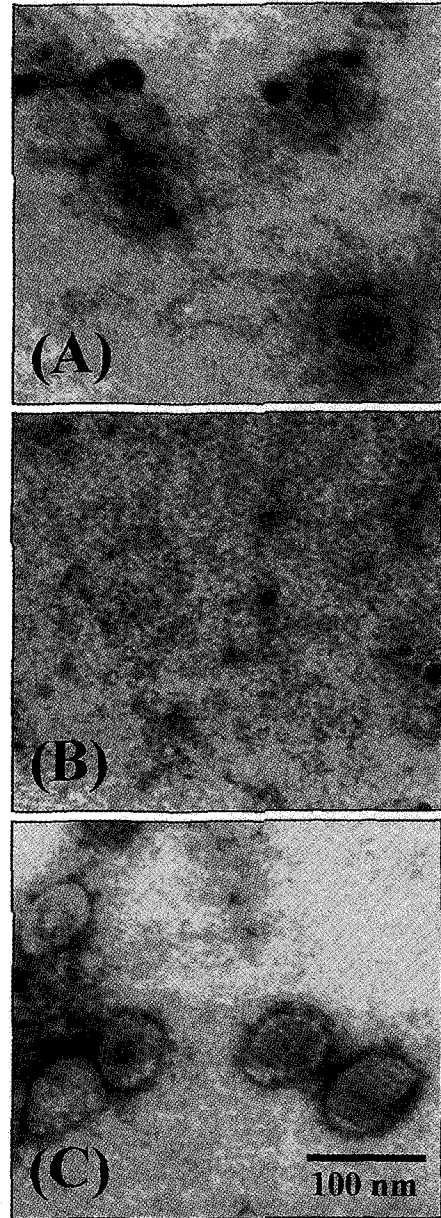


Figure 4—Electron microscopy of VLP. A) VLP purified from sf21 cells; B) disassembled VLP after treatment with β-mercaptoethanol; C) reassembled VLP (magnification, x 165,000).

kDa 분자량 위치에서 단일 밴드가 검출되어(Figure 3, 라인 C) 상기 곤충 세포주로부터 발현된 단백질이 목적하는 HPV 유사 입자 캡시드 단백질을 확인하였다.

바이러스 유사입자 및 분해, 재조립 상태의 3차원적 구조 확인

투과전자 현미경 관찰 결과인 figure 4A는 베쿨로바이러스 전이 벡터로 형질감염된 곤충 세포주로부터 발현된 단백

질이 목적하는 HPV 16의 크기(55 nm)와 유사한 크기를 가지는 바이러스 유사 입자임을 확인하였다. Figure 4B는 바이러스 유사 입자 5 µg을 환원제인 β-머캅토포에탄올 처리 후 관찰한 것으로서 VLP가 모두 단위 capsomer들로 분해되었음을 보여준다. 또한 단위 캡소머 단백질을 5 mM CaCl₂가 존재하는 인산염 완충용액 하에서 24시간 동안 투석하여 환원제를 제거한 경우 다시 분해이전의 바이러스 유사입자와 같은 모양의 입자들이 재조립되는 것이 확인되었다(Figure 4C).

pVAX/IL-2 plasmid 유전자의 제작 확인

pVAX/IL-2 plasmid 유전자가 제작되었는지를 확인하기 위하여 primer를 이용하여 PCR 산물의 band size를 측정하였다. 대조군으로는 IL-2 유전자가 삽입되지 않은 원래의 pVAX 벡터 DNA를 주형으로 하여 PCR 증폭하였다. 이로부터 증폭된 PCR 산물을 1% 아가로오즈 겔(agarose gel) 상에서 전기영동을 수행하였다. 그 결과, 대조군 pVAX 벡터는 약 140 bp 위치에서 DNA 밴드가 검출된 반면, 본 연구에서 제작된 pVAX/IL-2 벡터는 약 669 bp 위치에서 DNA 밴드가 검출되어 529 bp 크기의 IL-2 유전자가 pVAX 벡터 내로 삽입되었음을 확인하였다(Figure 5).

pVAX/IL-2 plasmid 유전자의 바이러스 유사입자 내 봉입 확인

pVAX/IL-2 plasmid 유전자가 바이러스 유사입자 내로 봉입되었는지 확인하기 위하여 DNase I 분해효소에 대한 pVAX/IL-2 plasmid 유전자의 안정성을 측정하였다. Figure 6의 레인 1 및 레인 2는 DNase I 분해효소 처리 전에 바이러스 유사 입자가 첨가되지 않은 대조군의 유전자 양과 바이러스 유사 입자가 처리된 실험군의 유전자 양을 나타내는 것이다. 바이러스 유사 입자 재조립 조건 하에서 DNase I 분해효소를 처리한 경우에는 재조립된 바이러스 유사 입자

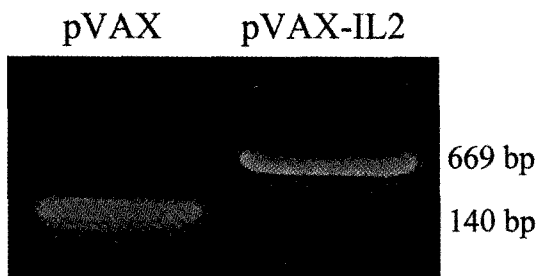


Figure 5—Electrophoresis of PCR products. Empty pVAX vector or pVAX/IL-2 vector was amplified by PCR using the same set of primers. After running 33 cycles, each PCR product was analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel.

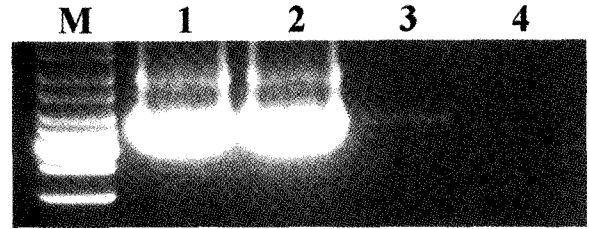


Figure 6—Gel electrophoresis after treatment of pVAX/IL-2-containing VLP with DNase I. M: Marker; Lane 1, Disassembled VLP + pVAX/IL-2 DNA; Lane 2, Free pVAX/IL-2 DNA; Lane 3, Reassembled VLP containing pVAX/IL-2 after DNase I, protease K treatment; Lane 4, Free pVAX/IL-2 after DNase I, protease K treatment

내부에 봉입된 유전자가 분해되지 않고 잔존하게 된다. 여기에 단백질 분해효소를 처리하게 되면 파필로마 바이러스 캡시드 단백질로 구성된 바이러스 유사 입자가 분해되어 IL-2 유전자 원래 크기의 DNA 밴드가 검출됨을 확인하였다(Figure 6, 레인 3). 반면, 바이러스 유사 입자가 존재하지 않은 경우에는 DNase I 분해효소 처리에 의해 전량의 IL-2 유전자가 모두 분해되어 아무런 밴드도 검출되지 않았다(Figure 6, 레인 4).

이상과 같이 본 연구에서는 파필로마 바이러스 캡시드 단백질의 구조 단백질 중 주요 단백질인 L1 캡시드 단백질 코딩 유전자를 증폭하기 위하여, 파필로마 바이러스 계놈을 주형으로 하고 L1 단백질 유전자를 특이적으로 인식하도록 고안된 프라이머를 사용하여 L1 유전자를 PCR로 증폭하고 곤충 세포주인 sf21에 L1 유전자를 포함하는 재조합 벡탈로바이러스 전이벡터를 형질감염하여 L1 단백질을 발현하는 형질감염 세포를 제조하였다. 상기 형질감염 세포로부터 발현되어 적당한 정제과정을 거쳐 특정 분획에서 면역 블롯 분석(immunoblot)을 수행하여 수득한 단백질은 쿠마시 염색과 웨스턴 블롯 분석 및 전자 현미경 관찰을 통하여 목적하는 파필로마 바이러스 캡시드 단백질 유사 입자임이 확인되었다.

본 발명의 바이러스 유사 입자를 유전자 수송체로 사용하는 경우에는 바이러스 유사 입자의 내부에 바이러스 유래 핵산이 존재하지 않으므로 기존에 사용되고 있는 바이러스성 수송체에서 지적되고 있는 체내 안전성의 문제를 해소할 수 있을 뿐만 아니라, 바이러스와 유사하게 세포 내로 수송되는 특징을 가지고 있기 때문에 기존의 비 바이러스성 수송체에서 한계점으로 지적된 체내 세포 내로의 수송 효율을 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 바이러스 유사 입자 내부에 목적하는 유전자를 함유하여 이를 체내로 수송하므로 체내 투여된 유전자가 유전자 분해효소에 의하여 신속히 분해되는 현상을 방지하고 수송된 유전자의 안정성을 증가시킬 수 있어 유전자 수송체로서의 개발 가능성이 예측된다.

IL-2 유전자가 anticancer gene therapy에서 사용되는 주요 유전자중의 하나이고 IL-2가 백신개발에서 adjuvant로서도 작용한다는 연구보고¹¹⁾는 본 연구의 IL-2 유전자 함유 수송체가 항종양 유전자 치료 요법 개발 및 보다 효과적인 백신개발에 활용될 가능성이 있음을 시사한다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(과제번호 1999-2-21700-001-3) 지원으로 수행되었음.

문 헌

- 1) F.L. Kisseljev, Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papillomavirus. *Biochemistry(Moscow)*, **65**, 68-77 (2000).
- 2) J.F. Hines, S. Ghim and A.B. Jensen, Prospects for human papillomavirus vaccine development: emerging HPV vaccines. *Curr. Opin. Obst. Gyn.*, **10**, 15-19 (1998).
- 3) P. Garliglio, L.B. Bribiesca, J. Berumen, J.M. Alcocer, R. Tamez and V. Madrid, Therapeutic uterine-cervix cancer vaccines in human. *Arch. Med. Res.*, **29**, 279-284 (1998).
- 4) H.A. Cubie, M. Plumstead, W. Zhang, O. Jesus, L.A. Duncan and M.A. Stanley, Presence of antibodies to human papillomavirus-like particles in 11-13 year old school girls. *J. Med. Virol.*, **56**, 210-216 (1998).
- 5) 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).
- 6) Pedroso de Lima MC, Simoes S, Pires P, Faneca H, Duzgunes N. Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 277-294 (2001).
- 7) N. Maurer, A. Mori, L. Palmer, M.A. Monck, K.W. Mok, B. Mui, Q.F. Akhong and P.R. Cullis, Lipid-based systems for the intracellular delivery of genetic drugs. *Mol. Membr. Biol.*, **16**, 129-140 (1999).
- 8) G.F. Lemkine and B.A. Demeneix, Polyethylenimines for in vivo gene delivery. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **3**, 178-182 (2001).
- 9) Y.K. Oh, J.P. Kim, H. Yoon, J.M. Kim, J.S. Yang and C.K. Kim, Prolonged organ retention and safety of plasmid DNA administered in polyethylenimine complexes. *Gene Ther.*, in press.
- 10) T.J. Son, N.K. Kim, H.J. Ahn, J.J. Ko, T.R. Hahn, D. Oh, K.Y. Cha and Y.K. Oh, Gene amplification and expression of the DNA repair enzyme, N-methylpurine DNA glycosylase (MPG) in HPV-infected cervical neoplasias. *Anticancer Res.*, in press.
- 11) M.T. Lotze, M. Shurin, C. Esche, H. Tahara, W. Storkus, J.M. Kirkwood, T.L. Whiteside, E.M. Elder, H. Okada and P. Robbins, Interleukin-2: developing additional cytokine gene therapies using fibroblasts or dendritic cells to enhance tumor immunity. *Cancer J. Sci. Am.*, **6**, S61-66 (2000).