

신약전달기술체계인 유전자 치료의 현재까지의 개발동향

배운성^{1,2} · 조정윤¹ · 지상미¹ · 이영주^{1*}

¹세종대학교 생명공학과, ²경동제약

(2002년 5월 6일 접수 · 2002년 6월 12일 재심사 · 2002년 7월 11일 승인)

Current Status of Gene Therapy as a New Drug Delivery System

YunSung Bae^{1,2}, JungYoon Cho¹, SangMi Ji¹ and YoungJoo Lee^{1*}

¹College of Engineering, Institute of Biotechnology, Department of Bioscience and Biotechnology, Sejong University, Seoul 143-747, Korea,

²Microbiology Laboratory, Quality Control Department, Kyung Dong Pharm. Co. Ltd., 535-3, Daeyang-ri, Yanggam-myun, Whasung, Kyunggi-do 445-930, Korea

(Received May 6, 2002 · Revised June 12, 2002 · Accepted July 11, 2002)

ABSTRACT—Gene therapy is fundamentally a sophisticated drug delivery technology to cure a disease by the transfer of genetic material to modify living cells. In other words, the gene is used as a therapeutic drug much like a chemical compound is employed in chemotherapy. Currently almost 600 clinical trials are underway worldwide since the first clinical trials carried out in 1990 to treat adenosine deaminase deficiency using retroviral vectors. Despite the great progress still is there no gene therapy product being approved as a new drug. This is partly due to a lack of an ideal gene delivery system that is safe and can provide stable, optimal level production of the therapeutic proteins in the cell. This review covers the current status of several different biological and physico-chemical agents that are being developed as gene delivery vehicles. Although gene therapy promises great hopes toward the cure of a broad spectrum of genetic and acquired diseases, the success of gene therapy heavily asks for the development of vector systems for safe and efficient application in humans.

Keywords—Gene therapy, Gene delivery system, Viral vector, Non-viral vector, Nanospheres

유전자치료 수행과정 및 현황

유전자치료는 환자가 가진 유전적 이상으로 생긴 질병을 치료하기 위하여 치료 유전자를 유전자 전달체를 이용, 표적 세포에 전달하여 이상 유전자를 대체하거나 치료용 단백질을 생산함으로써 질병을 치료하는 것이다.^{1,2)} 유전자치료법에는 다음 세 가지 방법이 있다. 첫째, 유전자를 수정하는 방법으로 결함이 있는 유전자의 염기서열을 고치는 방법이 있다. 두 번째 방법은 유전자 교환으로 결함 유전자를 제거하고 동일 위치에 정상 유전자를 이입하는 방법이다. 그러나 유전자 교환방법과 전술한 유전자 수정방법은 인체를 대상으로 하는 치료법으로는 실현 가능성이 낮은 관계로 많은 연구가 되고 있지 않다. 끝으로, 결함 유전자를 제거하지 않은 상태에서 정상기능을 수행하는 유전자를 유전자 전달체에 실어 표적세포에 전달하는 유전자 보강방법이 있다. 유전자 보

강 방법은 초기 adenosine deaminase 유전자 결손 치료에서 사용한 이래 가장 많이 연구되고 있는 분야이다.²⁾ 유전자의 인체내로의 전달방식은 *ex vivo*와 *in vivo*의 두 가지 형태로 나누어진다. 이 중 *ex vivo* 유전자 전달 방법은 환자에서 분리한 세포에 바이러스성 또는 비바이러스성 벡터를 이용 치료유전자를 이입한 후 환자에 수정한 세포를 재 이식하는 방법으로 유전자 전달효율이 높으며, 발현시간이 지속적이다. 반면 *in vivo* 유전자 전달방법은 치료유전자를 포함한 벡터를 환자에게 직접 주사하는 방법으로 유전자 전달효율이 떨어지며, 또한 유전자 발현이 일시적이다. 이러한 유전자 보강방법 중 *ex vivo* 유전자 전달의 수행 과정을 간략하게 살펴보면 다음과 같다. 우선 치료에 사용되는 정상 유전자를 확보한다. 이후 정상 유전자를 이입할 세포를 환자에게서 분리하는 과정이 따른다. 그리고 적당한 유전자 전달체에 치료유전자를 삽입하고, 이어 분리 정제된 세포에 치료유전자를 이입한다. 끝으로 치료유전자가 정상 이입된 세포만을 분리하여 다시 환자에게 이식하는 과정을 거친다. 인간을 대상으로 한 임상시험은 1990년에 시작되어 2002년 3월 현재

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)3408-3766, E-mail : yjlee@sejong.ac.kr

Table I—Statistics of protocols and patients by disease (Ref. 3)

질병	프로토콜		환자수	
	전체 수	%	전체 수	%
Cancer	376	63.1	2389	69
Monogenic diseases	75	12.6	309	8.9
Infectious diseases	38	6.4	408	11.8
Vascular disease	46	7.7	59	1.7
Other disease	11	1.8	19	0.5
Gene marking	48	8.1	274	7.9
Healthy volunteers	2	0.3	6	0.2
Total	596	100	3464	100

Table II—Statistics of protocols and patients by vectors used (Ref. 3)

벡터	프로토콜		환자수	
	전체 수	%	전체 수	%
Adeno-associated virus	13	2.2	36	1
Adenovirus	164	27.5	644	18.6
Gene gun	5	0.8	35	1
Herpes simplex virus	3	0.5	21	0.6
Lipofection	77	12.9	619	17.9
Naked DNA / Plasmid	55	9.2	93	2.7
Pox virus	37	6.2	88	2.5
Retrovirus	212	35.6	1755	50.7
RNA transfer	5	0.8	30	0.9
N/C	23	3.9	143	4.1
Total	596	100	3464	100

596개의 프로토콜 중 그 대부분은 미국과 유럽(약 97.1%)에서 수행되고 있다. 또한 임상중인 질병 중 암이 가장 많은 프로토콜 수를 점유하고 있으며, 그 다음으로 단일 유전자 결합 질병을 들 수 있다(Table I). 현재의 임상시험은 암이나 유전질환 이외에도 광범위한 질병을 대상으로 한 치료를 목적으로 하여 수행되고 있다. 또한 벡터별로는 임상시험에서 아직은 바이러스성 벡터를 주로 사용하고(약 70%) 있으며, 그 중 레트로바이러스 벡터를 가장 많이 사용하고 있다(Table II). 그리고 현재 임상 III상이 진행중인 건은 총 5건이며, 대부분은 임상 I 또는 임상 I/II단계에 머물러 있다. 이는 허가당국이 유전자치료에 대한 안전성에 확신을 갖지 못해 임상 I단계실험을 장기간에 걸쳐 수행하게 하기 때문이며, 또한 임상 I단계 시험에서 유전자 전달효율, 발현, 치료효과 면에서 대부분 실망스러운 결과를 보여주어 다음 단계로 진입하지 못했기 때문이다.^{4,5)} 즉, 대부분의 1세대 벡터들은 유전자 전달 및 숙주세포 내에서의 효율적인 유전자발현을 기대할 수 없었다.

유전자 전달계

유전자치료는 궁극적으로 인체를 대상으로 하는 신개념 치료법으로, 실질적으로 체내에서 유전자 발현의 효과가 나타나야 한다. 그러기 위해서는 특정세포에 대한 높은 선택성과 함께 표적세포로의 유전자 수송효율이 좋아야하므로 유전자를 효과적으로 전달하는 벡터 개발을 위한 많은 연구가 이루어지고 있다.⁶⁾ 현재까지 유전자 전달계로 가장 많이 연구되어진 분야는 바이러스를 이용한 바이러스 벡터와 리포솜을 이용한 비바이러스성 벡터이다. 특히 비바이러스성 벡터는 그 제조방법이 쉽고, 면역반응을 유발하지 않으며, 삽입되어지는 유전자의 크기에 제한이 없고, 특정세포에 표적화하기 위하여 리간드 또는 단 클론 항체를 결합하기 쉽다는 장점이 있다. 그러나 바이러스 벡터에 비해 트랜스펙션 효율이 낮으며, 유전자 발현 역시 일시적이라는 단점을 가지고 있다.⁷⁻⁹⁾ 그럼에도 불구하고 최근 리포솜을 이용한 많은 연구가 진행되고 있으며, 일부 괄목할 만한 성과를 보이고 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 바이러스 벡터들은 높은 유전자 전달 효율 등의 장점이 있으나 안전성에 대한 우려등의 단점이 있으며 다음에서 바이러스 벡터 시스템의 특징에 대해서 좀 더 구체적으로 소개하고자 한다.

레트로바이러스 벡터—레트로바이러스는 감염된 세포에서 RNA 게놈이 DNA로 전환되는 RNA 바이러스로써 그 구조는 gag, pol, env로 구분되는 3개의 유전자와 양끝에 Long terminal repeat sequence(LTRs)가 존재한다. LTRs에는 유전자의 삽입과 발현을 조절하는 프로모터 염기서열이 존재한다. 그리고 gag 앞에 packaging sequence(Ψ)라는 유전자 서열이 존재한다. 레트로바이러스 벡터는 유전자 전달 벡터와 packaging construct로 구성된다. 유전자 전달벡터는 바이러스 게놈을 encapsidation 하는데 필요한 Ψ 와 치료유전자를 가지고 있으며, packaging construct는 Ψ 이 대부분 결여되고 바이러스 단백질을 coding하는 유전자로 구성된다.⁹⁾ 즉, 벡터와 packaging construct가 동일 세포에 도입되면, packa-

Table III—Statistics of protocols and patients by clinical trial phases (Ref. 3)

질병	프로토콜		환자수	
	전체 수	%	전체 수	%
Phase I	395	66.3	1802	52
Phase I/II	125	21	904	26.1
Phase II	68	11.4	507	14.6
Phase II/III	4	0.7	N/C	-
Phase III	4	0.7	251	7.2
Total	596	100	3464	100

Table IV—Comparison of properties of viral vector systems (Ref. 8)

특징	레트로바이러스	아데노바이러스	아데노부속바이러스	렌티바이러스	히피스심플렉스바이러스
최대 이용가능 유전자 크기	7~7. kb	~30 kb	3.5~4.0 kb	7~8 kb	~20 kb
농도 (ml 당 바이러스 입자)	> 10 ⁸	> 10 ¹¹	> 10 ¹²	> 10 ⁸	> 10 ⁹
유전자 전달 경로	Ex vivo	Ex/In vivo	Ex/In vivo	Ex/In vivo	Ex vivo
숙주 게놈 삽입	Yes	No	Yes/No	Yes	No
장점	<ul style="list-style-type: none"> • Stable • Few immunological 	<ul style="list-style-type: none"> • Transfects dividing, nondividing cell • No insertional mutagenesis • Easy to scale up 	<ul style="list-style-type: none"> • Stable transfection site specific integration • Long expression 	<ul style="list-style-type: none"> • Long expression • Few immunological 	<ul style="list-style-type: none"> • Large insert size • Neurone specificity
단점	<ul style="list-style-type: none"> • Transient expression • Insertional mutagenesis? 	<ul style="list-style-type: none"> • Transient expression • Triggers immune response toxicity 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficult to purify • Difficult to scale up • small insert size 	<ul style="list-style-type: none"> • Insertional mutagenesis? 	<ul style="list-style-type: none"> • Transient expression

ging construct로부터 공급되어지는 구조단백질들이 복제된 치료유전자를 packaging하여 바이러스 입자를 만든다. 이렇게 만들어진 바이러스 입자는 표적세포에 감염되어 벡터구조만이 숙주세포의 염색체내로 삽입되어 발현한다. 레트로바이러스 벡터는 이와 같이 숙주세포의 DNA에 삽입이 되므로 장기발현이 가능하다는 장점이 있는 동시에 삽입 돌연변이 유발 가능성의 단점이 있다(Table IV). 그리고, 분열 세포에만 감염한다는 한계가 있다.¹⁰⁾ 현재 Herpes simplex virus-thymidine kinase 유전자를 이용한 항암제 개발 시도가 임상 III상 시험 진행 중으로 가장 진전된 임상 case이다.³⁾

아데노바이러스 벡터-아데노바이러스는 선형 이중 가닥의 DNA를 갖고 있는 non-enveloped virus의 일종으로 분열/비분열세포 모두에 유전자 전달과 발현이 가능하다는 장점을 가지고 있다.¹⁴⁾ 그 외 10¹¹~10¹² pfu/ml의 상당히 농축된 바이러스 입자를 얻을 수 있어 scale-up이 가능하며, 암유발의 가능성이 없다는 장점을 가지고 있다(Table IV). 그러나, 바이러스 입자가 거의 모든 세포에 감염이 가능하기 때문에 주변 정상세포에 독성을 가질 수 있으며, 숙주 염색체내로 삽입되지 않아 장기간의 유전자 발현이 불가능하다.¹⁴⁾ 또한, 아데노바이러스가 가지고 있는 가장 큰 문제는 면역학적인 문제로 대부분의 사람들이 이미 자연에 존재하는 아데노바이러스에 노출되어 아데노바이러스에 대한 항체를 가지고 있어 정상적인 유전자치료를 위한 벡터로 사용하는데 제약이 따른다.¹⁵⁾ 이러한 이유로 아데노바이러스성 벡터는 만성질환의 장기적 치료에는 적합하지 않으나 일부 급성질환에서 세포를 직접 죽이는 데는 유용하게 사용될 수 있다. 특히 p53 유전자를 전달하여 암세포를 사멸시키는 프로토콜과 fibro-

blast growth factor 유전자를 전달하여 혈관질환을 치료하는 프로토콜이 임상시험 III상에 있으며 좋은 결과를 보이고 있다.^{3,16,17)}

아데노부속 바이러스 벡터-아데노부속 바이러스는 parvovirus에 속하는 단일 가닥의 DNA를 갖는 바이러스로써 단독으로는 복제를 할 수 없으며, 아데노바이러스나 vaccinia 또는 herpes virus 등의 helper virus와 함께 감염되었을 때 복제, 증식할 수 있는 바이러스이다.¹⁸⁾ 예로 아데노부속 바이러스는 사람의 19번 염색체의 특정부위 내로 삽입되어 잠복상태로 있다가 helper virus가 감염되면 증식, 발현한다.¹⁹⁾ 이러한 아데노부속 바이러스의 게놈은 4681 bp의 DNA로 구성되어있으며, 양끝에 145 bp의 inverted terminal repeat (ITR)을 갖고 있으며 이는 복제와 포장에 관여한다. 그리고 ITR 내부에는 복제에 관여하는 rep와 구조단백질을 coding 하는 cap 유전자가 있다.¹⁸⁾ 이 rep과 cap 유전자는 일반적으로 벡터 제조시 치료 유전자로 대체된다. 이러한 아데노부속 바이러스는 사람세포에 잠복감염이 가능하고, 숙주염색체 내로의 삽입이 세포성장에 어떠한 변화도 야기하지 않으며, 다양한 세포에 효율적으로 감염될 수 있다(Table IV). 끝으로 아데노바이러스처럼 면역반응을 유도하지 않는다는 장점을 가지고 있어 활용이 늘어나고 있는 벡터 시스템이다. 현재 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) 유전자를 이용한 프로토콜이 임상시험 II상에 있는 case가 있으며, 임상 III상 진행중인 건은 없다.³⁾

히피스심플렉스 바이러스 벡터-히피스심플렉스 바이러스는 중추신경계에 특이적으로 감염하는 DNA 바이러스로 큰 사이즈의 게놈을 갖고있어 큰 크기의 목적 유전자를 전달할

수 있는 장점이 있는 반면 현재 많이 이용하는 다른 벡터들에 비해 80개 이상의 유전자를 포함하고있는 복잡한 계놈을 갖는 바이러스로 효율적이고 안전한 벡터를 쉽게 제조하기가 힘든 것이 단점이다.^{7,20)} 대부분의 허피스시플렉스 바이러스 벡터는 HSV-1으로부터 제조한 것이다. 허피스시플렉스 바이러스 벡터는 알츠하이머 병, 파킨슨 병 등의 신경계 질환을 치료하기 위해 개발되고 있을 뿐만 아니라, 중추신경계의 암세포를 표적하기 위한 벡터 시스템으로도 사용가능하기 때문에 앞으로 신경계 질환의 유전자 치료에 사용되는 주요 벡터 시스템이 될 것이다.^{21,22)}

렌티바이러스 벡터- 렌티바이러스는 레트로바이러스의 일종으로 *in vivo*에서 분열세포 뿐만이 아니라 망막세포 신경세포, 근육세포 그리고 간세포와 같은 비분열세포에도 유전자 전달이 가능하며 8 kb 정도의 크고 복잡한 유전자를 효율적으로 목적세포 또는 조직에 전달할 수 있는 특징을 가지고 있다.^{23,24)} 대표적인 렌티바이러스로 human immunodeficiency virus(HIV)를 들 수 있다. HIV 벡터의 경우 HIV 외막 단백질을 VSV-G 단백질로 대체 했을 때 포장 세포로부터 쉽게 1000배까지 바이러스 농축이 가능하다는 것과 VSV-G 단백질로 pseudotyping 되었을 때 유전자 발현이 유도되었다는 보고도 있다.²⁵⁾ 또, 다른 벡터에 비해 면역반응을 잘 유도하지 않는다는 보고들이 있어 보다 안전한 렌티바이러스 벡터를 비분열 세포인 신경세포를 목표로 한 벡터 시스템으로 개발하고 있다.

비바이러스성 벡터

비바이러스성 벡터는 독성이 없고, 면역반응을 거의 유도하지 않으며 제조하기 쉽고, 전달할 유전자의 크기 제한이 없다는 등 유전자 전달 시스템으로서 유용한 많은 장점들을 가지고 있지만 바이러스성 벡터에 비해 트랜스펙션 효율이 낮은 것 이외에 실제 *in vivo*에서 많은 장애물들(혈청 단백질 또는 면역세포를 포함한 혈구세포)에 의해 표적세포로의 전달이 쉽지 않은 점등이 해결해야 할 과제로 현재 높은 트랜스펙션 효율, 원하는 세포로의 표적화, 생체 내 장애물, 세포 내 장애물(엔도솜, 라이소솜)들을 극복할 수 있는 안전한 벡터 시스템 개발을 주요 목표로 비바이러스성 벡터에 대한 많은 연구들이 진행 중에 있다.^{1,6,26)}

리포솜- 리포솜은 비바이러스성 벡터 시스템에 광범위하게 이용되는 방법으로 제조하기 쉽고, 전달과정 중에 효소에 의한 DNA 분해를 방어할 수 있으며, 세포독성이 거의 없다는 장점이 있어 많이 사용되고 있으나 바이러스성 벡터 시스템에 비해서 트랜스펙션 효율이 낮고 혈청성분에 의해서 리포솜의 특성이 변화해 트랜스펙션 활성이 감소하는 단점

들을 극복하고자 연구가 활발히 진행되고 있다.^{2,27)}

리포솜은 지질의 전하에 따라 크게 양이온성 리포솜과 음이온성 리포솜으로 나눌 수 있다. 양이온성 리포솜은 1987년을 시작으로 가장 많이 연구되어온 비바이러스성 전달 시스템으로 양이온성 지질과 리포솜/DNA 복합체를 안정화시키는 협조지질로 제조하는 것으로 최초로 제품화된 양이온성 리포솜은 Lipofectin(N-[1-(2,3-dioleoyloxypropyl)-N,N,N-trimethyl-ammonium chloride mixed with dioleoylphosphatidylethanolamine)이며 지금까지도 많이 사용되고 있다. 현재 lipofectin에 의해 IL-2, CFTR, HLA-B7/Beta 2-Microglobulin, Leuvectin+Vical VCL-1102+IL-2 유전자를 전달한 프로토콜들이 임상시험 중에 있다.^{3,28)} 양이온성 리포솜은 제조가 쉽고, 독성이 거의 없으며, 음전하를 띠는 DNA와 쉽게 복합체를 형성한다는 장점이 있는 반면 안정성에 한계가 있으며, 혈청 하에서 양이온성 리포솜/DNA 복합체는 음전하를 띠는 단백질과 흡착해 양전하가 중화되고 복합체 크기가 커져서 유전자 발현율이 감소하는 등의 단점이 있다.^{29,30)} 현재 이상적인 리포솜 개발을 위해 양이온성 지질의 구조 및 특성, 리포솜의 조성 및 형태, 리포솜/DNA 전하 비율, 리포솜/DNA 복합체 크기 등 다양한 인자들을 연구하여 트랜스펙션 효율을 높여려는 노력이 활발히 진행 중이다.^{31,32)} 음이온성 리포솜은 양이온성 리포솜보다 안정하며 독성이 거의 없다는 장점이 있어 비바이러스성 전달 시스템으로 이용하려는 노력들을 하고있는데 음이온성 리포솜과 DNA는 같은 음전하를 띠고 있어 DNA를 리포솜에 효율적으로 봉입시키는 방법과 DNA의 생리적 활성이 그대로 유지되는 기술이 필요해 이에 대한 연구가 진행중이며, 음이온성 리포솜처럼 세포막도 음전하를 띠고 있기 때문에 DNA를 표적세포에 전달하는 것 또한 해결해야 할 과제로 이것은 지질에 리간드를 붙여서 수용체를 매개로 한 엔도사이토시스에 의한 표적세포로의 유전자 전달이 가능하다.^{28,33,34)} 한 예로 리포솜에 apolipoprotein E를 흡착시켜 HUVEC 세포로의 트랜스펙션 효율을 증가시킨 경우도 있으며, 계속해서 연구가 진행 중이다.^{2,35)} 그밖에 리포솜으로는 면역성 리포솜, 용해성 리포솜, pH 감응성 리포솜, 온도 감응성 리포솜 등이 있다.³⁶⁾

고분자성 물질- 비바이러스성 수송체중의 하나로 양이온성 리포솜에 비해서 DNA를 효과적으로 축합하는 것이 가능하며, DNA는 세포질에서 불안정하기 때문에 빠른 시간에 핵으로 이동되어야 하는데 이것은 핵으로의 유전자 전달을 도우며, 핵산 분해효소로부터 방어한다.²⁾ 고분자성 물질로는 polyethylenimine(PEI), poly-L-ornithine, poly-L-lysine(PLL), poly(2-dimethylamino)ethyl methacrylate, chitosan등이 있는

데 몇몇의 경우 고분자성 물질만을 사용했을 때 트랜스펙션 효율이 감소했다는 보고들이 있어 최근에는 트랜스펙션 효율을 높이기 위해 먼저 양이온성 고분자 물질로 플라즈미드 DNA를 축합시킨 후 양이온성 리포솜과 복합체를 형성하여 사용하는 방법들이 연구되고 있으며, 새로운 고분자성물질 또한 개발되고 있다. 한 예로 최근에 개발된 ExGen은 PEI의 family로 DNA/ExGen 복합체는 빨리 세포에 의해 엔도사이토시스되는 특징을 가지고 있어 primary cell line의 트랜스펙션 효율을 높였다고 한다.²⁸⁾

*Nanosphere-in vivo*에서 벡터가 모세혈관(약 5 μm) 그리고, 혈관의 내피세포사이의 gap(30-500 nm), 엔도사이토시스 과정에 의한 세포로의 이동과정에서 nano 수준의 벡터크기가 요구된다.²⁾ 최근들어 gelatin 또는 chitosan 같은 polycation과 DNA의 염-유도 복합체 반응에 의해 형성된 nanosphere는 새로운 유전자 전달체로 평가되어 지고 있다. DNA-gelatin nanosphere는 양전하를 띠는 gelatin과 음전하를 띠는 DNA간의 전기적 상호작용에 의해 형성된 것으로 독성이 없고 면역반응을 거의 유도하지 않으며, 핵산분해효소로부터 DNA를 방어할 수 있어 생체이용율이 높고, 높은 이온농도의 용액에서도 안정하다는 장점이 있어 이용예가 증가하고 있다. 실제로 nanosphere를 마우스에 근육주사시 유전자 발현율이 높았으며 장기간 발현이 지속되었다는 보고도 있다.³⁷⁾ DNA-chitosan nanosphere는 chitosan과 DNA가 결합함으로써 핵산분해효소로부터 DNA의 절단을 방어할 수 있고 독성이 없으며 면역반응을 거의 유도하지 않으나 트랜스펙션 효율이 세포 형태에 의존한다는 한계가 있다. DNA-chitosan nanosphere를 이용한 실험의 예로서 HEK 293과 IB-3-1 세포에서 높은 유전자 발현율을 보였다는 보고도 있고,³⁸⁾ *in vivo*에서는 pH sensitive endosomolytic peptide를 포함한 DNA 복합체를 토끼에 직접 주입시 결장과 소장에서 정상적인 유전자 발현이 이루어진 보고도 있다.³⁹⁾

이 두 유전자 전달 시스템은 리간드를 nanosphere에 쉽게 붙임으로서 표적화 또는 수용체 매개를 통한 엔도사이토시스를 촉진시켜 트랜스펙션 효율을 높일 수 있고 lysosomolytic agent 사용 시 엔도솜과 라이소솜에서 DNA가 분해되는 것을 줄일 수 있으며, 다른 생리활성 물질 또는 다기능 플라즈미드를 같이 캡슐화 하여 전달이 가능하고, 또 트랜스펙션 기능의 소실 없이 동결건조하여 보관이 가능하다.

유전자치료의 개발전략 및 향후 전망

유전자치료법에 대한 일반적인 내용, 유전자치료를 위한 각종 벡터시스템의 특징과 종류 및 현재까지의 임상 및 개

발전략에 대해 살펴보았다. 유전자 전달시스템으로 사용될 수 있는 벡터는 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터가 있으며, 이중 바이러스성 벡터는 지난 수년간 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노부속바이러스 벡터 전 영역에 걸쳐 안전성을 높이고 유전자 전달효율 및 발현효율을 높이는 데 많은 진전을 보았으나, 항상 내부적으로는 인체 안전성 및 면역원성, 세포독성의 위험이 상존한다. 반면에 양이온성 리포솜과 naked DNA와 같은 비바이러스성 벡터는 안전성과 제조방법이 쉬운 장점이 있으나, 트랜스펙션 효율이 낮고, 유전자 발현이 일시적이라는 단점이 있다. 이러한 유전자 전달 벡터 시스템의 문제점을 극복하기 위한 개발전략을 수립하는데 있어 가장 중요한 문제는 제조방법이 간편하면서도 인체에 무해하며 안전하게 치료유전자를 전달하여 장시간 발현을 유지해야 한다는 것이다. 이를 위해 벡터 및 기타 첨부 물질의 입자크기, 전하밀도, 리간드의 친화성 및 배치, 세포 내 유동 등을 심도 있게 연구해야 할 것이다. 그 예로, 세포핵으로의 수송과 유전자 발현을 촉진하기 위해 바이러스성 핵 전달신호를 이용하는 방법이 연구되고 있으며, 특이성을 높이기 위하여 조직 특이적인 조절 프로모터를 사용하기도 한다. 그리고 최근 제안되어지고 있는 유전자치료요법의 개발전략으로는 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터를 동시에 사용하는 방법으로 바이러스성 벡터를 리포솜에 봉입한 virosome을 이용하여 면역반응을 회피함으로써 트랜스펙션 효율을 높인 결과가 보고된바 있다.⁴⁰⁾ 그 외 인터루킨이나 인터페론 등의 싸이토카인을 리포솜에 첨가하여 백신으로 개발하는 방법등이 있다. 결론적으로 최근 수년간에 걸쳐 1세대 벡터들의 단점을 극복하는데 성공하였으며, 전술한 다양한 임상시험을 통해 유전자치료의 효능이 입증되고 있다.⁴¹⁻⁴³⁾ 비록 아직은 초기단계라고 볼 수 있으나 향후 비약적인 발전을 이루어 인간의 질병치료에 획기적인 전기를 마련하게 될 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 2001년도 국립독성연구소 용역연구개발사업 연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) J. Smith, Y. Zhang and R. Niven, Toward development of a non-viral gene therapeutic, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **26**, 135-150 (1997).
- 2) M. Nishikawa and L. Huang, Nonviral vectors in the new millennium: Delivery barriers in gene transfer, *Hum. Gene*

- Ther.*, **12**, 861-870 (2001).
- 3) The Journal of Gene Medicine website (<http://www.wiley.co.uk/genetherapy>), Wiley.
 - 4) R.M. Blease, K.W. Culver, A.D. Miller, C.S. Carter, T. Fleisher, M. Clerici, G. Shearer, L. Chang, Y. Chiang, P. Tolstoshev, J.J. Greenblatt, S.A. Rosenberg, H. Klein, M. Berger, C.A. Mullen, W.J. Ramsey, L. Muul, R.A. Morgan and W.F. Anderson, T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: Initial trial results after 4 years, *Science*, **270**, 475-480 (1995).
 - 5) K.R. Clark, X. Liu, J.P. McGrath and P.R. Johnson, Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses, *Hum. Gene Ther.*, **10**, 1031-1039 (1999).
 - 6) K.W. Peng, Strategies for targeting therapeutic gene delivery, *Mol. Med. Today*, **5**, 448-458 (1999).
 - 7) A. Pfeifer and I.M. Verma, Gene therapy: Promises and Problems, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **2**, 177-211 (2001).
 - 8) W.J. Choi and C.K. Kim, Recent advance and future strategy in gene delivery system, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **30**, 1-12 (2000).
 - 9) I.M. Verma and N. Somia, Gene therapy-promises, problems and prospects, *Nature*, **389**, 239-242 (1997).
 - 10) G.J. Nabel, E.G. Nabel, Z.Y. Yang, B.A. Fox, G.E. Plautz, X. Gao, L. Hung, S. Shu, D. Gordon and A.E. Chang, Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: Expression, biological activity, and lack of toxicity in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 11307-11311 (1993).
 - 11) W.F. Anderson, Human gene therapy, *Nature*, **392**, 25s (1998).
 - 12) C. Plank, K. Mechtler, F.C. Szoka and E. Wagner, Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: A potential barrier for intravenous gene delivery, *Hum. Gene Ther.*, **7**, 1437-1446 (1996).
 - 13) D. Armentano, J. Zabner, C. Sacks, C.C. Sookdeo, M.P. Smith, J.A. George, S.C. Wadsworth, A.E. Smith, R.J. Gregory, Effect of the E4 region on the persistence of transgene expression from adenovirus vectors, *J. Virol.*, **71**, 2408-2416 (1997).
 - 14) T. Shenk, Adenoviruses: The viruses and their replication. in *Virology* (Fields, B. N., et al., eds) 2111-2148, *Raven Publishers, Philadelphia*, (1996).
 - 15) N. Chirmule, K. Propert, S. Magosin, Y. Qian, R. Qian and J. Wilson, Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans, *Gene Ther.*, **6**, 1574-1583 (1999).
 - 16) G.L. Clayman, A.K. el-Naggar, S.M. Lippman, Y.C. Henderson, M. Frederick, J.A. Merritt, L.A. Zumstein, T.M. Timmons, T.J. Liu, L. Ginsberg, J.A. Roth, W.K. Hong, P. Bruso and H. Goepfert, Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma, *J. Clin. Oncol.*, **16**, 2221-2232 (1998).
 - 17) J. Nemunaitis, S.G. Swisher, T. Timmons, D. Connors, M. Mack, L. Doerksen, D. Weill, J. Wait, D.D. Lawrence, B.L. Kemp, F. Fossella, B.S. Glisson, W.K. Hong, F.R. Khuri, J.M. Kurie, J.J. Lee, J.S. Lee, D.M. Nguyen, J.C. Nesbitt, R. Perez-Soler, K.M. Pisters, J.B. Putnam, W.R. Richli, D.M. Shin, G.L. Walsh, J. Merritt and J. Roth, Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.*, **18**, 609-622 (2000).
 - 18) N. Muzyczka, Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **158**, 97-129 (1992).
 - 19) M.G. Kaplitt, P. Leone, R.J. Samulski, X. Xiao, D.W. Pfaff, K.L. O'Malley and M.J. During, Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain, *Nature Genet.*, **8**, 148-154 (1994).
 - 20) B. Roizman, The function of herpes simplex virus genes: a primer for genetic engineering of novel vectors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 11307-11312 (1996).
 - 21) D.J. Fink, L.R. Sternberg, P.C. Weber, M. Mata, W.F. Goins and J.C. Glorioso, *In vivo* expression of β -galactosidase in hippocampal neurons by HSV-mediated gene transfer, *Gene Ther.*, **3**, 11-19 (1992).
 - 22) J.C. Glorioso, W.F. Goins and D.J. Fink, Herpes simplex virus-based vectors, *Semin. Virol.*, **3**, 265-276 (1992).
 - 23) R. Zufferey, D. Nagy, R.J. Mandel, I. Naldini and D. Trono, Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*, *Nat. Biotechnol.*, **15**, 871-875 (1997).
 - 24) T. Kafri, U. Blomer, D.A. Peterson, F.H. Gage and I.M. Verma, Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors, *Nat. Genet.*, **17**, 314-317 (1997).
 - 25) L. Naldini, U. Blomer, F.H. Gage, D. Trono and I.M. Verma, Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 11382-11388 (1996).
 - 26) E. Tomlinson and A.P. Rolland, Controllable gene therapy Pharmaceuticals of non-viral gene delivery systems, *J. Control. Rel.*, **39**, 357-372 (1996).
 - 27) J.P. Yang and L. Huang, Overcoming the inhibitory effect of serum on lipofection by increasing the charge ratio of cationic liposome to DNA, *Gene Ther.*, **4**, 950-960 (1997).
 - 28) S.G. Martin and J.C. Murray, Gene-transfer systems for human endothelial cells, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **41**, 223-233 (2000).
 - 29) S. Li, M.A. Rizzo, S. Bhattacharya and L. Huang, Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery, *Gene Ther.*, **5**, 930-937 (1998).
 - 30) S. Li, W.C. Tseng, D.B. Stolz, S.P. Wu, S.C. Watkins and L. Huang, Dynamic changes in the characteristics of cationic lipidic vectors after exposure to mouse serum: implications for intravenous lipofection, *Gene Ther.*, **6**, 585-594 (1999).
 - 31) P.C. Ross, M.L. Hensen, R. Supabphol and S.W. Hui, Multilamellar cationic liposomes are efficient vectors for *in vitro* gene transfer in serum, *J. Liposome Res.*, **8**, 499-520 (1998).

- 32) D.V. Schaffer and D.A. Lauffenburger, Optimization of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery, *J. Biol. Chem.*, **273**, 28004-28009 (1998).
- 33) P. Schoen, L. Bijl and J. Wilschut, Efficient encapsulation of plasmid DNA in anionic liposomes by a freeze/thaw-extrusion procedure, *J. Liposome Res.*, **8**, 485-497 (1998).
- 34) G.Y. Kao, L.J. Change and T.M. Allen, Use of targeted cationic liposomes in enhanced DNA delivery to cancer cells, *Cancer Gene Ther.*, **3**, 250-256 (1996).
- 35) R. Sipehia and G. Martucci, High-efficiency transformation of human endothelial cells by Apo E-mediated transfection with plasmid DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 206-211 (1995).
- 36) C.R. Dass, T.L. Walker, M.A. Burton and E.E. Decruz, Enhanced anticancer therapy mediated by specialized liposomes, *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 972-975 (1995).
- 37) V.L. Truong-Le, J.T. August and K.W. Leong, Controlled gene delivery by DNA-gelatin nanospheres, *Hum. Gene Ther.*, **9**, 1709-1717 (1998).
- 38) H.Q. Mao, K. Roy, V.L. Truong-Le, K.A. Janes, K.Y. Lin, Y. Wang, J.T. August and K.W. Leong, Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency, *J. Control. Rel.*, **70**, 399-421 (2001).
- 39) F.C. MacLaughlin, R.J. Mumper, J. Wang, J.M. Tagliaferri, I. Gill, M. Hinchcliffe and A.P. Rolland, Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery, *J. Control. Rel.*, **56**, 259-272 (1998).
- 40) P. Yotnda, D.H. Chen, W. Chiu, P.A. Piedra, A. Davis, N.S. Templeton and M.K. Brenner, Bilamellar cationic liposomes protect adenovectors from preexisting humoral immune responses, *Mol. Ther.*, **5**, 233-241 (2002).
- 41) I. Baumgartner, A. Pieczek, O. Manor, R. Blair, M. Kearney, K. Walsh and J.M. Isner, Constitutive expression of phVEGF 165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia, *Circulation*, **97**, 1114-1123 (1998).
- 42) D.W. Losordo, P.R. Vale and J.M. Isner, Gene therapy for myocardial angiogenesis, *Am. Heart J.*, **138**, S132 (1999).
- 43) M. Cavazzana-Calvo, S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J.L. Casanova, P. Bousso, F.L. Deist and A. Fischer, Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease, *Science*, **288**, 669 (2000).