

E1 유전자 변이체 아데노바이러스를
이용한 Herpes Simplex Virus
Thymidine Kinase 유전자의 도입과
발현이 인체 암세포주의 Ganciclovir
감수성에 미치는 영향

연세대학교 대학원
의 과 학 과
고 동 현

E1 유전자 변이체 아데노바이러스를
이용한 Herpes Simplex Virus
Thymidine Kinase 유전자의 도입과
발현이 인체 암세포주의 Ganciclovir
감수성에 미치는 영향

지도교수 윤 채 옥

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2004년 12월 일

연세대학교 대학원

의 과 학 과

고 동 현

감사의 글

드디어 저에게도 논문이라는 것이 생겼습니다. 이 논문을 쓰기 위해 크고 작은 힘든 일들이 많이 있었지만 드디어 나올 것이 나오고야 말았습니다. 이 논문을 다 쓴 순간 정말 내가 쓴 것이 맞나하고 제 뺨까지 꼬집어 봤는데 아픈 것이 정말 내가 쓴 게 맞구나 하고 실감을 할 수가 있었습니다. 제가 보기에도 아직도 부족한 것이 많은 논문이지만 나름대로 열심히 썼기에 완성된 논문을 보는 순간 가슴이 뿌듯했습니다. 대학을 졸업하고 석사과정에 들어오면서 제가 공부를 잘 배워갈 수 있을까 하는 생각이 많이 들었습니다. 하지만 제가 지금까지 힘든 공부를 하면서 버틸 수 있었던 것은 제 주위 사람들의 도움이 없었다면 지금의 ‘나’가 없지 않았나 생각이 됩니다. 지금 이 논문도 마찬가지라 생각됩니다. 비록 논문은 제가 썼지만 이 논문이 나오기까지 나 뿐만 아니라 선생님들과 실험실 사람들의 도움이 없었다면 이 논문은 세상을 보지 못하고 그냥 잊혀져 버렸을지도 모릅니다. 이 논문이 나오기까지 힘써주신 모든 분들께 진심으로 감사를 드립니다. 가장 먼저 저의 실험실 대모이시며 지도교수님이신 윤채옥 교수님께 감사를 드리고 싶습니다. 바쁜 와중에도 좀 더 나은 논문을 만들기 주시기 위해 여러모로 많은 신경을 써 주셔서 지금의 이 논문이 나올 수

있게 만들어 주셨습니다. 실험실의 대부이시며 우리 실험실이 항상 잘 되도록 이끌어 주시는 김주향 교수님, 그리고 바쁜 와중에도 제 논문이 이 세상에 나올 수 있도록 관심을 가져주신 장진우 교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 알게 된지 오래되진 않지만 제 논문에 관심이 많으셔서 좀 더 나은 논문이 되도록 조언을 해주신 김현희 선생님, 떠나면 타국에 오셔서 공부를 열심히 하시는 동물 실험의 대가 황경화 선생님, 입학하면서부터 지금까지 나에게 있어서 실험이면 실험, 개인적인 고민이면 고민 등 이것저것 상담도 많이 해주고 친누나같이 잘 챙겨준 영숙이 누나, 나에게 실험이 무엇인지 알게 해준 내 논문의 또 다른 공로자인 재성이 형, 내가 힘들 때 든든한 힘이 되어준 대학교 선배이자 실험실 선배인 대봉이 형, 지금 같이 있진 않지만 항상 저에 대해서 신경 써 준 은희 누나에게 고맙다는 말을 전하고 싶습니다. 실험실의 이런 저런 모든 일에 신경을 쓰는 숨은 일꾼 평환이, 덜렁대지만 실험엔 열중하는 지영이, 나와 같이 논문을 쓰느라 고생한 태영이, 실험실 분위기 메이커이며 막내라고 모든 잡일을 도맡아 하며 내가 이빠라 하는 동생 일규, 이것저것 항상 열심히 하는 실험실의 또 다른 막내인 윤아, 그리고 제 2 암연구소에 있는 경주에게 고마운 마음을 표하고 싶습니다. 지금은 졸업하고 다른 곳에서 새로이 자기 할 일을 하고 있는 태영이와 은아에게 좋은 결실을 맺기를 기원합니다. 이번에 새로이 입학하는 민정씨와 실험

실 귀염둥이 아름이, 새내기 오준이와 민주, 그리고 다시 실험을 시작하시는 손주혁 선생님께도 좋은 결실을 맺기를 기원합니다. 또 우리가 실험에만 열중할 수 있도록 실험실의 모든 사무적인 일들을 도맡아서 해주신 박선순 선생님과 박근호 선생님, 행정업무를 보는 선영이, 그리고 논문을 쓰는데 많은 격려를 해준 나의 초등학교 친구인 혜연이, 정민이, 은정이, 중수, 선정이, 세희, 성혁이, 수련이, 승재와 대학교 친구인 호원이, 대학 후배인 주영이에게 고마움을 전합니다.

제가 지금 이 자리까지 설 수 있도록 가장 든든하게 후원해 주신 우리 아버지와 어머니, 그리고 동욱이 형, 우리 고씨 집안의 가장 큰 어른이시며 제가 공부할 수 있도록 후원을 마다하지 않으신 큰아버지와 큰어머니께 감사를 드립니다. 그리고 힘든 공부한다며 많은 격려를 해준 든든한 맏형인 민근이 형과 형수님, 그리고 경범이 형과 작은 형수, 작은 집 동생인 태욱이와 진욱이에게 고마움을 전합니다.

저자 씀

<차례>

그림 차례	iii
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	9
1. 대상 세포주 및 세포배양	9
2. 실험동물	9
3. HSV-TK를 발현하는 아데노바이러스들의 제작 및 생산	9
4. 재조합 아데노바이러스 Ad-TK들의 유전체 분리와 PCR 분석	11
5. Immunoblotting 분석	12
6. 재조합 아데노바이러스의 증식 및 세포 살상능 검증	13
7. MTT 분석에 따른 세포 생존율 검사	13
8. GCV와의 병용 투여에 의한 증식 가능 아데노바이러스의 증식능 변화 검증	14
9. 생체 내 항종양 효과 검증	15
III. 결과	16
1. HSV-TK를 발현하는 E1 유전자 변이체 아데노바이러스들의 유전자 구성과 단백질 발현 양상 조사	16

2. 세포 살상능 비교 검증	20
3. 증식 가능 아데노바이러스와 ganciclovir 병용 처리에 의한 암세포 살상능 상승효과 비교 검증	20
4. GCV와의 병용 투여에 따른 증식 가능 아데노바이러스의 증식능 비교 검증	24
5. 생체 내 항종양 효과 비교 검증	27
 IV. 고찰	 31
 V. 결론	 35
 참고문헌	 36
 영문요약	 41

그림 차례

Figure 1. A schematic representation of recombinant adenoviruses used in this study	10
Figure 2. Characterization of E1 mutant adenoviruses expressing HSV-TK gene	18
Figure 3. Detection of the E1A, E1B 19kDa, E1B 55kDa and HSV-TK protein by Western blot analysis	19
Figure 4. Cytopathic effects of recombinant adenoviruses expressing HSV-TK <i>in vitro</i>	21
Figure 5. <i>In vitro</i> cytotoxicity of recombinant adenoviruses expressing HSV-TK combined with GCV treatment	23
Figure 6. Viral production assay	25
Figure 7. Effects of recombinant adenoviruses expressing HSV-TK against C33A and A549 tumors in male athymic nude mice	28

국문 요약

E1 유전자 변이체 아데노바이러스를 이용한 Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase 유전자의 도입과 발현이 인체 암세포주의 Ganciclovir 감수성에 미치는 영향

유전자 치료에 이용된 대부분의 초기 아데노바이러스 벡터는 치료 유전자가 삽입된 증식 불능 아데노바이러스로 일회성의 감염으로 인하여 치료효과가 낮은 단점이 부각되었다. 이를 극복하기 위하여, 암세포 특이적으로 복제하여 치료 유전자를 지속적으로 발현할 수 있는 증식 가능 아데노바이러스에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는, 아데노바이러스의 초기 발현 유전자 E1B의 구성 유전자들인 19kDa과 55kDa이 서로 다르게 조합된 3종류의 E1B 변이체 증식 가능 아데노바이러스의 암세포 살상능을 배가시키기 위한 방안으로, 각각의 E1B 변이체 아데노바이러스에 억제 감수성 유전자인 Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase(HSV-TK) 유전자를 도입하여 Ad- Δ E1B19-TK, Ad- Δ E1B55-TK, Ad- Δ E1B19/55-TK를 제작하였으며, 이와 더불어 E1이 소실된 증식 불능 아데노바이러스에 HSV-TK를 도입하여 Ad- Δ E1-TK를 제작하였다. 세포 살상능을 가시적으로 확인할 수 있는 CPE assay를 통해, Ad- Δ E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, 그리고 Ad- Δ E1B55-TK와 같은 증식 가능 아데노바이러스들은 바이러스 증식에 따른 세포 살상을 유도하고, 특히 Ad- Δ E1B19-TK의 세포 살상능이 가장 우수함을 확인할 수 있었다. 또한, GCV의 병용 투여에 의한 상승적 세포 살상능을 검증하기 위하여 수행한 MTT assay 결과, GCV의 농도가 증가함에 따라 HSV-TK 유전자를 발현하는 아데노바이러스들의 세포 살상능이 크게 증가하였으

며, 특히 증식 불능 아데노바이러스인 Ad- Δ E1-TK에 비하여 증식 가능 아데노바이러스와 GCV를 병용 처리한 경우의 세포 살상 효과가 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었다. HSV-TK 유전자를 발현하는 4종류의 E1 유전자 변이체 아데노바이러스들과 GCV의 병용 투여에 따른 생체 내 항종양 효과를 비교한 결과, Ad- Δ E1-TK와 GCV를 병용 투여한 경우에는 HSV-TK를 발현하는 증식 가능 아데노바이러스와 GCV를 함께 투여한 경우에 비해 현저히 낮은 항종양 효과가 유도되었으며, 특히 Ad- Δ E1B19-TK와 GCV를 병용 투여한 경우에 항종양 효과가 가장 높게 유도되는 것을 관찰할 수 있었다. 결과적으로, 본 연구에서 제작된 3종류의 E1B 변이체 아데노바이러스에 HSV-TK 유전자가 삽입된 증식 가능 아데노바이러스들은 바이러스의 활발한 증식에 따른 세포 살상 뿐 아니라 HSV-TK 유전자의 지속적인 고발현으로 총체적인 세포 살상을 현저히 증가시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 이는 나아가 암 치료에 필요한 아데노바이러스의 투여량을 줄일 수 있어 바이러스로 인한 독성과 숙주의 면역반응을 감소시켜 유전자 치료의 안전성을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : replication-competent adenovirus, HSV-TK, ganciclovir, bystander effect, E1B 19kDa, E1B 55kDa, apoptosis

E1 유전자 변이체 아데노바이러스를 이용한 Herpes Simplex
Virus Thymidine Kinase 유전자의 도입과 발현이
인체 암세포주의 Ganciclovir 감수성에 미치는 영향

<지도교수 윤채욱>

연세대학교 대학원 의과학과

고 동 현

I. 서론

유전자를 질병치료에 이용하는 “유전자 치료”라는 개념의 정립은 유전자 전달방법의 획기적인 발전에 따라 가능하게 되었다. 질병의 치료에 유전자를 사용하기 위한 시도는 이미 1960년대에 CaPO_4 법을 이용하여 골수세포에 정상 유전자를 전달하는 방법을 시작으로 하여¹⁻², 1983년에 레트로바이러스 벡터라는 효율적인 유전자 전달방법이 개발된 후에 활발히 이루어졌다³. 유전자 치료를 질병 치료에 최초로 이용한 것은 ADA 결핍증 환자의 골수세포에 정상 ADA 유전자를 도입, 발현시킨 경우이다³. 이 치료를 받은 환자는 현재도 정상적인 생활을 유지하고 있어 유전자 치료의 임상적인 적용 가능성을 확실히 보여준 사례로 평가된다. 현재 유전자 치료는 초기의 유전병, 암뿐만 아니라 AIDS, 허혈성 심장질환과 당뇨병 등에도 널리 연구 및 적용되고 있다.

1980년대 후반부터 급속히 연구되기 시작한 유전자 치료법의 개발로 수많은 희망적인 결과들이 제시되고 있지만, 유전자 치료가 상용화되어 실질적인 치료법으로 이용되기 위해서는 무엇보다도 먼저 치료용 유전자를 원하는 부위에 안전하면서도 효과적으로 전달하여 주는 유전자 전달체의 개발이 선행되어야 한다. 이러한 요건을 충족시킬 수 있는 이상적인 유전자 전달체의 필수 요건으로는, 첫째, 생체 내에서 치료 유전자가 충분한 기간 동안 발현될 수 있도록 치료 유전자를 전달하는 유전자 전달체가 안정적이어야 하며(stability), 둘째, 유전자 전달체가 생체 내에서 면역 반응이나 독성을 유발하지 말아야 하며(safety), 셋째, 대상세포에 선별적으로 유전자 전달이 가능하게 하여 치료효과가 원하는 조직 또는 세포에서만 국소적으로 일어나고 그 외 정상조직이나 다른 장기로의 불필요한 유전자 전달을 방지할 수 있어야 하며(specificity), 넷째, 유전자 전달체가 인체 내에서 암을 유발하지 말아야 하며(nononcogenicity), 다섯째, 효과적인 유전자 전달을 위하여 복제하는 세포뿐만 아니라 복제하지 않은 세포들도 유전자 전달을 할 수 있어야 한다(infectivity to nondividing cell)⁴⁻⁷.

Dr. Graham은 1984년에 재조합 아데노바이러스(recombinant adenovirus)를 유전자 전달체로써 이용할 수 있는 가능성을 최초로 보고하였다⁸. 재조합 아데노바이러스는 세포의 분열상태에 관계없이 다양한 종류의 세포에 대한 유전자 전달능력이 우수하며, 높은 역가의 바이러스를 쉽게 생산할 수 있고, 동결건조가 가능할 정도로 구조적으로 안정하며, 약제화가 상대적으로 용이하며, 비교적 큰 크기의 치료 유전자를 전달할 수 있다⁹. 또한 현재 유전자 치료법에 주로 이용되고 있는 아데노바이러스 아형 2와 5는 인체 내에서 전혀 암을 유발하지 않는 점 등의 여러 가지 장점들이 부각되면서 각종 질환 치료용 유전자 전달체로 개발되고 있다. 그러나 기존의 암 치료용 재조합

아데노바이러스는 대부분이 증식 불가능한 제 1세대 바이러스로 이들을 유전자 전달체로 이용하는 경우는 일차 감염세포 또는 극히 일부의 주변세포들에만 항암효과를 유발할 수 있어, 임상적인 실용성 면에서 많은 제약이 있다. 이를 극복할 수 있는 한 방안으로 암세포에서만 선택적으로 증식하여 암세포를 살상하는 종양세포 특이적 살상 아데노바이러스에 대한 연구가 McCormick 그룹에 의해 처음 보고된 이후 종양세포 특이적 살상 아데노바이러스의 가능성이 다각도로 연구되고 있다^{8, 10}.

아데노바이러스의 감염 초기에 발현되는 단백질들은 크게 E1A와 E1B 단백질들로 나뉘며 E1B 단백질들은 다시 E1B 19kDa와 E1B 55kDa로 나뉘어진다. 야생형 아데노바이러스가 정상세포를 감염하면, 감염된 세포는 종양 억제 단백질인 p53을 활성화시켜 바이러스의 증식을 억제하는데 이때 아데노바이러스 E1B 55kDa은 E4orf6 단백질과 함께 종양 억제 단백질인 p53 단백질에 결합하고 ubiquitine에 의한 분해를 유도함으로써 p53의 기능을 억제하는 역할을 하며⁸, 이에 따라 야생형 아데노바이러스는 활발하게 증식을 하여 궁극적으로 감염세포의 살상을 유도한다. 하지만 E1B 55kDa 유전자가 소실된 재조합 아데노바이러스가 정상세포를 감염하면 이들 세포에 있는 p53의 비활성화를 유도할 수 없어 바이러스의 증식이 억제되지만, p53의 기능이 억제되어 있는 여러 암세포들에서는 바이러스의 증식이 활발하게 일어나게 되어 궁극적으로 감염세포의 살상을 유도하게 된다. E1B 55kDa 단백질은 이상과 같은 p53을 불활성화시키는 기능 외에도 아데노바이러스 mRNA의 세포질로의 이동이나 아데노바이러스의 구성 단백질의 핵으로의 이동 등에도 관련이 있는 것으로 보고 되고 있다. 따라서 E1B 55kDa는 아데노바이러스의 효과적인 복제에 필요한 유전자로서 이것이 소실된 아데노바이러스는 암세포 내에서의 바이러스 증식이 제한되게 일어날 수밖에 없어 이로 인한 항종양 효과가 감소

될 수 있다. 아데노바이러스 E1B의 또 다른 유전자인 E1B 19kDa은 강력한 세포고사(apoptosis) 억제제로서 Bcl-2와 염기서열 및 그 기능이 유사하다. E1B 19kDa은 아데노바이러스의 초기 발현 유전자인 E1A에 의해 유도되는 세포고사를 억제하는 물질로 잘 알려져 있으며, 여러 사람의 종양세포들에서 p53에 의하여 유도되어지는 세포고사도 억제시킨다는 결과가 보고 되었다¹¹⁻¹⁴. 또한, 성장 인자(growth factor)의 결핍이나 방사선 치료, 또는 항암제에 의해 유도되는 세포고사를 억제하는 데 있어서 E1B 19kDa과 Bcl-2가 기능적으로 같은 역할을 할 수 있음이 보고된 바 있다¹⁵. 그리고 E1B 19kDa 유전자의 일부가 소실된 증식 가능 아데노바이러스는 바이러스 증식에 따른 세포괴사(necrosis) 뿐 아니라 세포고사를 동시에 유도할 수 있어 암세포 살상효능이 더욱 증가된다는 결과도 보고되었다¹⁶.

암유전자 치료시 암세포 살상능을 향상시킬 수 있는 전략으로는 Herpes simplex virus의 thymidine kinase(HSV-TK)나 *E. coli*의 cytosine deaminase(CD)와 같은 약제 감수성 유전자, p53과 같은 종양 억제 유전자¹⁷⁻¹⁸, 면역치료(immunotherapy)를 위한 interleukin 또는 tumor necrosis factor 유전자¹⁹, 효과적인 화학요법치료를 위한 MDR(multidrug resistance) 유전자, 그리고 antisense RNA를 합성하기 위한 antisense DNA등²⁰의 이용이다. 이들 중, HSV-TK는 현재 가장 많은 빈도로 사용되어지는 약제 감수성 유전자로, 독성이 없는 전약제인 ganciclovir(GCV)를 인산화시켜 감염된 세포의 DNA 합성을 억제하여 분열하는 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있는 암치료 유전자이다²¹⁻²⁴. Thymidine kinase는 DNA 합성시 salvage pathway에 이용되는 효소로 HSV-TK는 thymidine 뿐만 아니라 nucleotide analogs이면서 항바이러스 제제로 이용되는 acyclovir와 ganciclovir도 인산화시킬 수 있다²⁵. GCV는 세포 내에서 HSV-TK 효소에 의해 ganciclovir-monophosphate로 바뀌고 다음 단계에서 세포의 kinase

효소에 의해 ganciclovir-triphosphate의 형태로 전환된다²⁵. Ganciclovir-triphosphate는 DNA 합성시 DNA 사슬에 삽입되어 DNA 사슬 형성을 중단시켜 결과적으로 DNA 합성을 억제하게 된다²². 즉, 정상세포에는 독성이 없는 전약제인 ganciclovir를 전신적으로 투여했을 때, HSV-TK를 발현하는 아데노바이러스로 감염된 암세포에서만 HSV-TK에 의하여 전약제가 인산화되어 암세포를 사멸시킬 수 있게 된다. 또한 죽은 암세포의 apoptosis vesicle을 인접한 살아있는 암세포가 식세포작용(phagocytosis)함으로서 HSV-TK가 이입되지 않은 암세포에도 ganciclovir-triphosphate가 들어가 세포사를 일으켜 bystander effect를 유도할 수 있으며, 암세포에 대한 면역반응이 유도됨으로써 bystander effect가 나타나게 한다²⁶. 이것은 현재 암치료를 위한 유전자 요법의 가장 큰 문제점인 모든 암세포에 치료 유전자를 이입할 수 없다는 결점을 부분적으로 보완할 수 있다는 점에서 중요한 의미를 갖는다.

따라서 본 연구에서는, 여러 종류의 E1B 유전자 변이체 증식 가능 아데노바이러스의 암세포 살상능을 배가시키기 위한 방안으로, 약제 감수성 유전자인 HSV-TK 유전자를 형질 도입하여 암세포들의 약제 감수성(drug-sensitivity)을 증대시키고자 하였다. 또한, 아데노바이러스의 E1B 19kDa의 세포고사 억제제로서의 역할이나 E1B 55kDa의 바이러스 복제에 관련된 기능 및 p53의 불활성화 기능에 따른 E1B 유전자 변이체의 종합적인 암세포 살상능을 비교하고, 각각의 E1B 유전자 변이체 아데노바이러스에 HSV-TK 유전자를 도입하여 아데노바이러스의 증식에 따른 세포 살상뿐만 아니라 전약제에 의한 암세포 살상을 함께 유도하고자 하였다. 즉, E1B 19kDa 단백질의 기능 상실에 의한 세포 살상능의 증폭 가능성과 E1B 55kDa 유전자의 소실에 의한 암세포의 대한 특이적 살상능, 그리고 이와 더불어 HSV-TK를 E1 유전자 변이체 아데노바이러스들에 조합함으로써, 더

욱 증가된 세포 살상능을 가진 증식 가능 아데노바이러스의 전체적인 효율성을 평가하고자 하였다. 증식 가능 아데노바이러스는 일차로 감염된 세포를 살상할 뿐만 아니라 감염세포에서 증식된 바이러스의 이차적인 감염으로 주변의 세포들을 연쇄적으로 감염시키고 살상할 수 있으므로, 이러한 증식 가능한 아데노바이러스에 세포 살상을 유도할 수 있는 약제 감수성 유전자들인 HSV-TK를 도입한다면, 아데노바이러스의 증식에 의한 세포 살상 효과뿐만 아니라 HSV-TK의 지속적인 발현으로 전약제에 의한 암세포 살상이 증가되어 치료효과가 극대화된 새로운 암 치료법으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 세포주 및 세포배양

실험에 사용된 세포주들은 폐암 세포주(A549), 인체 간암 세포주(Hep1), 자궁암 세포주(C33A)이며, 모두 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA)에서 구입하였다. 모든 세포주들은 10%의 우태아혈청(GIBCO, Grand Island, NY)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; GIBCO) 배양액으로 항생제 penicillin/streptomycin(GIBCO)을 첨가하여 5% CO₂의 존재 하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다.

2. 실험동물

생체 내 항종양 실험은 6~8주령의 수컷 누드 생쥐 (BALB/c-nu; SLC, Japan)를 구입하여 시행하였다. 동물 사육실의 온도는 22 ± 2°C, 습도는 55~60% 로 유지시켰으며, 명암 순환이 12시간 단위로 조절되게 하였고, 방사선 조사로 멸균한 고형사료(중앙 실험동물, Seoul, Korea)와 멸균된 급수를 자유로이 섭취하게 하였다.

3. HSV-TK를 발현하는 아데노바이러스들의 제작 및 생산

아데노바이러스의 E3 부위에 HSV-TK 유전자가 삽입된 아데노바이러스를 만들기 위하여, 먼저 HSV-TK 유전자를 발현하는 E3 셔플백터를 제작하였다. Cytomegalovirus(CMV) promoter에 의해 HSV-TK가 발현되는 pCA14/E1AE1B19-TK(이용준 박사, University

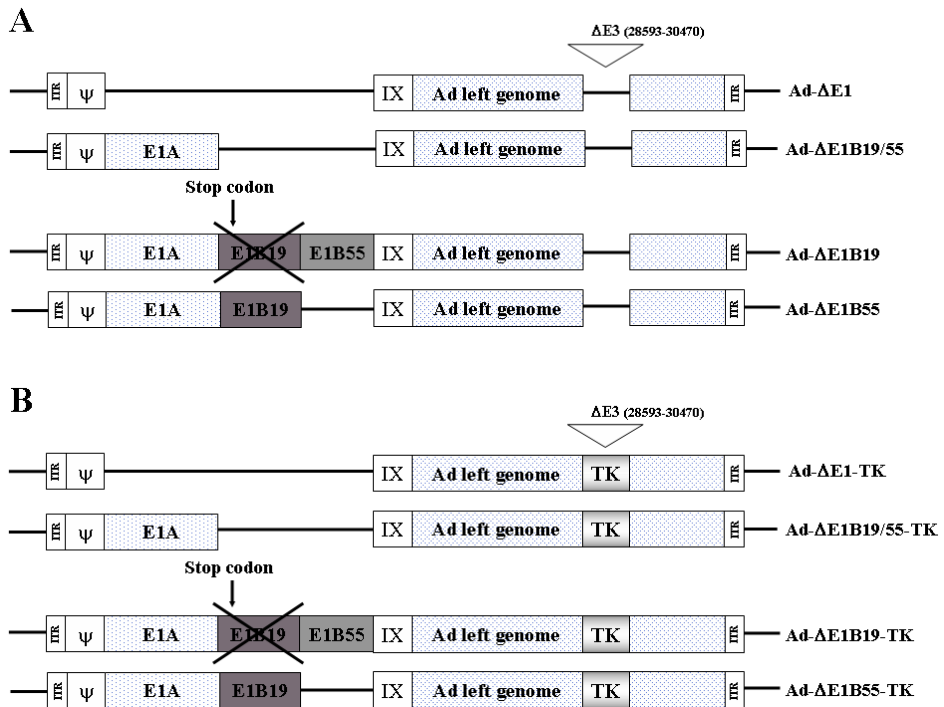


Figure 1. A schematic representation of recombinant adenoviruses used in this study. (A) Ad- Δ E1 has the whole E1 region deleted; Ad- Δ E1B19/55 contains E1A, but is E1B19 kDa and E1B55 kDa deleted; Ad- Δ E1B19 contains the normal E1A and E1B55 kDa, but is E1B19 kDa translation initiation codon mutated; Ad- Δ E1B55 contains the normal E1A and E1B19 kDa, but is E1B55 kDa deleted. (B) Ad- Δ E1-TK, Ad- Δ E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, and Ad- Δ E1B55-TK comprise the TK gene inserted into the E3 region of Ad- Δ E1, Ad- Δ E1B19/55, Ad- Δ E1B19, and Ad- Δ E1B55, respectively.

of Pittsburgh, USA)로부터 CMV promoter와 HSV-TK 부위를 *Bgl* II 제한효소로 처리하여 E3 셔틀벡터인 pSP72ΔE3의 *Bam*HI 제한효소 부위에 삽입함으로써 pSP72ΔE3/CMV-TK를 제작하였다. 아데노바이러스 아형 5의 E1 부위가 변형된 재조합 아데노바이러스 즉, E1 부위가 모두 결실된 증식 불능 바이러스인 Ad-ΔE1, E1B 19kDa과 E1B 55kDa 부위가 모두 제거된 Ad-E1B19/55, E1B 19kDa 부위가 불활성화된 Ad-ΔE1B19, 그리고 E1B 55kDa 부위가 제거된 Ad-ΔE1B55 아데노바이러스 벡터를 각각 *Spe* I 제한효소로 절단하여 단일가닥으로 만든 뒤, 상기에서 제작된 HSV-TK가 삽입된 E3 셔틀벡터인 pSP72ΔE3/CMV-TK를 *Xmn* I 제한효소로 절단하여 대장균 BJ5183에 동시형질 전환시켜 유전자 상동 재조합(homologous recombination)을 유도하였다. BJ5183에서 획득한 상동 재조합된 플라스미드 DNA는 그 양이 상대적으로 적으므로 다시 DH5a 대장균에 형질 전환시켜 DNA를 증폭시켰다. DH5a 대장균으로부터 상동 재조합된 플라스미드 DNA를 수득하고 *Hind*III 제한효소로 처리하여 각각의 재조합된 아데노바이러스 유전체들을 선별하였다. 재조합된 아데노바이러스 플라스미드를 *Pac* I 제한효소로 처리한 뒤 293 세포주에 lipofectamine(GIBCO)을 이용하여 transfection시켜 Ad-ΔE1-TK, Ad-ΔE1B19/55-TK, Ad-ΔE1B19-TK, 그리고 Ad-ΔE1B55-TK 재조합 아데노바이러스를 생산하였다(Fig.1).

4. 재조합 아데노바이러스 Ad-TK들의 유전체 분리와 PCR 분석

폐암 세포주인 A549에 Ad-ΔE1-TK, Ad-ΔE1B19/55-TK, Ad-ΔE1B19-TK, 그리고 Ad-ΔE1B55-TK 아데노바이러스를 multiplicity of infection(MOI) 10으로 각각 감염시키고 48시간 후

genomic isolation kit(Qiagen, Santa Clarita, CA)로 바이러스 유전체를 회수하였다. 수득한 아데노바이러스 유전체를 주형으로 하고 E1A, E1B 19kDa, E1B 55kDa, 그리고 HSV-TK 유전자를 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set(E1A: sense 5'-GATCGAAGAGGTACTGGCTGATA-3', antisense 5'-CCACAGGTCCTCATATAGCAAAG-3'; E1B 19kDa: sense 5'-ATCTGACCTCATGGAGGCTTGG-3', antisense 5'-GCGGACGGAAGACAACAGTAGC-3'; E1B 55kDa: sense 5'-GATAGATACGGAGGATAGGGTGG-3', antisense 5'-TGGAGTTACCCTCAGACAGGATA-3' HSV-TK sense, antisense)들을 이용하여 PCR을 수행한 뒤, 각각의 E1A, E1B 19kDa, E1B 55kDa, HSV-TK에 대한 PCR 생성물들을 섞어서 하나의 agarose well에 loading하여 전기영동 하였다.

5. Immunoblotting 분석

자궁암 세포주(C33A)에 재조합 아데노바이러스들을 20 MOI의 역가로 감염시키고 48시간 후 감염된 세포를 회수하여 lysis buffer(50 mM HEPES containing 0.15 M NaCl, 0.5% Nonidet P-40 and protease inhibitors: PMSF, TLCK and TPCK)로 세포를 해리시키고 SDS-PAGE(sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 전기영동을 시행하였다. 전기영동 후 gel에 있는 단백질을 PVDF membrane에 electro-transfer한 뒤 E1A 단백질(sc-430; Stratagene), E1B 19kDa 단백질(DP17; Oncogene, Uniondale, NY), E1B 55kDa 단백질(Dr. Thomas Dobner, Rosensburg University, Germany), HSV-TK 단백질, β -actin(Sigma, St. Louis, MO)을 특이적으로 인지하는 항체들을 각각 일차 항체로 hybridization시키고 HRP(horse radish peroxidase)가 결합된 goat

anti rabbit IgG(sc-2004; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) 또는 goat anti mouse IgG(sc-2005; Santa Cruz Biotech)를 hybridization 시킨 후 ECL(Enhanced chemiluminescence: sc-2048; Santa Cruz Biotech) 방법으로 X-선 필름에 감광시켜 mambrane 상의 단백질과 항체와의 결합여부를 조사하고 각 단백질의 발현양상을 확인하였다.

6. 재조합 아데노바이러스의 증식 및 세포 살상능 검증

재조합 아데노바이러스의 암세포 및 정상 세포에 대한 세포 살상 능력을 검증하기 위하여 폐암 세포주(A549), 인체 간암 세포주(Hep1), 자궁암 세포주(C33A)에 0.1 ~ 50 MOI 역가의 재조합 아데노바이러스들을 각각 감염시켰다. 모든 종류의 바이러스 중 어느 한 바이러스가 가장 낮은 역가에서 감염세포를 거의 사멸시킨 시점에 모든 배지를 제거하고 0.5% crystal violet(in 50% methanol)으로 잔존한 세포들을 고정시키고 염색한 후 분석하였다.

7. MTT 분석에 따른 세포 생존을 검사

종양 특이적 살상 아데노바이러스의 감염 시간에 따른 세포 살상능을 정량화하기 위해 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 2 mg/ml) assay를 시행하였다. 이는 살아있는 세포에서는 미토콘드리아의 succinate dehydrogenase에 의해 용해성의 tetrazolium염이 불용성의 formazan 침전물로 전환이 되는 점을 이용하여 분광 흡도계(spectrophotometer)로 광학밀도를 측정하여 살아있는 세포의 수를 측정하는 방법이다. 암세포주와 정상 세포주들을 48-well plate에 각각 30~80% confluency로 분주하고 24시간 후 각각의 바이러스들을, Hep1은 10 MOI, C33A와 A549는 3 MOI로 각각 감염시켰다. 바이러

스 감염 후 24시간 뒤에 전약제인 ganciclovir(GCV; F.Hoffman-La Roche Ltd, Basel, Switzerland)를 0 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고, 전약제 처리 4일 후에 MTT를 2 mg/ml 의 농도로 phosphate-buffered-saline(PBS; GIBCO.)에 녹여 125 μl 씩 plate well에 첨가하여 4시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 상층액을 제거하였다. 남아 있는 well에 1 ml의 DMSO(dimethyl sulfoxide; Sigma, St. Louis, U.S.A.)를 첨가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 각 well을 96-well plate에 200 μl 씩 옮기고 multi-well ELISA automatic spectrometer reader(Behring ELISA ProcessorII, Germany)를 이용하여 540 nm 파장에서 광학밀도(색소 흡수율)를 측정된 후 대조군의 광학밀도와 비교하여 다음과 같은 공식으로 세포의 생존률을 구하였다.

$$\text{생존률(\%)} = \frac{\text{실험군의 평균 색소 흡수율} - \text{기준 색소 흡수율}}{\text{대조군의 평균 색소 흡수율} - \text{기준 색소 흡수율}} \times 100$$

8. GCV와의 병용 투여에 의한 증식 가능 아데노바이러스의 증식능 변화 검증

HSV-TK의 전약제인 GCV를 처리한 경우의 증식 가능 아데노바이러스들의 종양 세포 내 증식능 변화를 검증하기 위해, 24-well plate에 2×10^4 개의 A549 세포주를 분주하고 24시간 후 각각의 아데노바이러스들을 10 MOI로 감염시켰다. 24시간 후 GCV를 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하고 대조군으로는 세포에 GCV를 처리하지 않았다. GCV 처리 후 날짜에 따른 바이러스 생산량이 세포 내, 혹은 세포 외부에 따라 달라지는지 조사해 보기 위해 감염한 지 1일, 3일, 그리고 5일째 되는 날 감염된 세포와 배지를 각각 회수하였다. 감염된 세포는 3번의 얼림과 녹임을 반복하여 바이러스를 수득하였다. 날짜별로 수득한 세포 내, 세포 외 바이러스를 각각 293 세포주에서 limiting titeration

assay에 의해 바이러스 역가를 산출하였다.

9. 생체 내 항종양 효과 검증

생후 7 ~ 8주 정도 경과된 누드마우스에 1×10^7 개의 C33A 또는 A549 세포주를 복부 피하에 주사하였다. 종양의 용적이 약 70 ~ 80 mm³ 정도 되었을 때, 1×10^8 plaque-forming unit(PFU)/50 μ l의 재조합 아데노바이러스들을 이틀 간격으로 세 번 종양 내에 직접 주사하고 24시간 후부터 12시간 간격으로 14일 동안 GCV(100 mg/kg)를 복강 내에 투여하였다. 바이러스 투여 후, 2~3일 간격으로 종양의 크기를 측정하였다. 음성 대조군으로 PBS를 종양 내 주사하였으며, 종양의 용적은 caliper로 종양의 단축과 장축을 측정하여 다음과 같은 공식으로 산출하였다.

$$\text{종양의 용적(mm}^3\text{)} = \text{(단축 mm)}^2 \times \text{장축 mm} \times 0.523$$

III. 결 과

1. HSV-TK를 발현하는 E1 유전자 변이체 아데노바이러스들의 유전자 구성과 단백질 발현 양상 조사

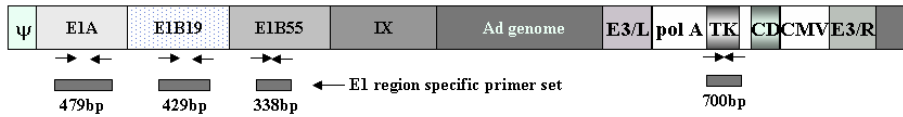
HSV-TK 유전자를 발현하는 증식 불능 아데노바이러스인 Ad- Δ E1-TK와 E1B 19kDa과 E1B 55kDa 유전자가 서로 다르게 조합된 3종류의 증식 가능 아데노바이러스 Ad- Δ E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, 그리고 Ad- Δ E1B55-TK를 제작한 후(Fig. 1), 이들 재조합 아데노바이러스들의 유전체 내 E1 및 HSV-TK 유전자의 구성을 확인하였다. 이를 위해 E1A, E1B 19kDa, E1B 55kDa, 그리고 HSV-TK 유전자에 대한 특정 primer set을 각각 이용하여 PCR을 수행하였으며, 이들 아데노바이러스에 의해 발현되는 E1A, E1B 19kDa, E1B 55kDa 및 HSV-TK 단백질들의 발현 양상을 검증하기 위해 immunoblotting을 시행하였다. 먼저 A549 폐암 세포주에 Ad- Δ E1-TK, Ad-E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, 또는 Ad- Δ E1B55-TK를 각각 20 MOI로 감염시킨 후 세포로부터 바이러스 유전체를 회수하였다. 수득한 바이러스 유전체를 주형 DNA로 하여 각각의 특정 primer set들로 PCR하여 증폭된 산물의 존재 여부와 크기를 분석하였다(Fig. 2). 아데노바이러스의 E1 유전자가 결손된 증식 불능 아데노바이러스인 Ad- Δ E1-TK로 감염된 세포에서는 HSV-TK 유전자(700 bp) 산물만이 생성되었으며, Ad- Δ E1B19/55-TK를 감염시킨 경우에는 E1B 19kDa과 E1B 55kDa 유전자들이 결손되어 있어 E1A 유전자(479 bp)와 HSV-TK 유전자(700 bp) 산물이 생성되었다. 하지만, Ad- Δ E1B19-TK는 E1B 19kDa 유전자의 개시 코돈이 제거되고 대신에 종결 코돈이 삽입됨으로서 그 기능은 소실되었지만 E1B 19kDa의 유전자는 그대로 존재하여, E1B 19kDa 특정 primer set에 의해서 E1B 19kDa 유전자(429 bp) 산물 및 E1B 55kDa 유전자(338 bp), E1A 유

전자(479 bp) 그리고 HSV-TK 유전자(700 bp) PCR 산물들이 모두 생성되었다. Ad- Δ E1B55-TK로 감염된 세포에서는 E1A 유전자(479 bp), HSV-TK 유전자(700 bp), 그리고 E1B 19kDa(429 bp) 유전자에 대한 PCR 산물들이 생성되었지만, E1B 55kDa 유전자의 소실로 E1B 55kDa에 대한 특정 primer set에 의해서는 PCR 산물이 생성되지 않았다(Fig. 2).

이들 각각의 재조합 아데노바이러스 유전자 구성을 단백질 수준에서 검증하기 위하여, 상기한 네 종류의 바이러스와 대조군으로 E1 전체가 소실된 Ad- Δ E1과 야생형 아데노바이러스인 Ad-WT 바이러스에 의해 각각 감염된 C33A 세포주로부터 모든 단백질들을 회수하여 E1A, E1B 19kDa, E1B 55kDa, 그리고 HSV-TK 단백질들의 발현 양상을 immunoblotting을 시행하여 확인하였다(Fig. 3). E1A 단백질은 E1 전체 부위가 소실된 음성대조군인 Ad- Δ E1과 Ad- Δ E1-TK를 제외한 4종류의 아데노바이러스들에 의해 감염된 세포 모두에서 발현되었다. E1B 19kDa의 경우에는, Ad- Δ E1B55-TK와 Ad-WT에 의해 감염된 세포에서는 발현되었으나, E1B 19kDa 유전자가 소실된 Ad- Δ E1B19/55-TK와 E1B 19kDa 유전자의 개시코돈이 돌연변이되어 있는 Ad- Δ E1B19-TK로 감염된 세포에서는 전혀 발현되지 않았다. 그리고 E1B 55kDa 단백질은 Ad- Δ E1B19-TK와 Ad-WT로 감염된 세포에서만 높게 발현되는 것을 관찰할 수 있었다. 음성대조군으로 사용된 Ad- Δ E1은 감염된 세포에서 E1에 관련된 어떠한 단백질도 발현되지 않았다. 또한 HSV-TK를 포함하는 모든 재조합 아데노바이러스인 Ad- Δ E1-TK, Ad- Δ E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, Ad- Δ E1B55-TK로 감염된 세포에서는 HSV-TK 단백질이 발현되었다. 특히, 증식 불가능 아데노바이러스인 Ad- Δ E1-TK로 감염된 경우에는 증식 가능 아데노바이러스(Ad- Δ E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, Ad- Δ E1B55-TK)로 감염된 경우에 비해 HSV-TK의 발현이 낮게 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 이상과 같은 재조합 아데노바이러스들의 유전자 구성 및

A

Ad-TK



B

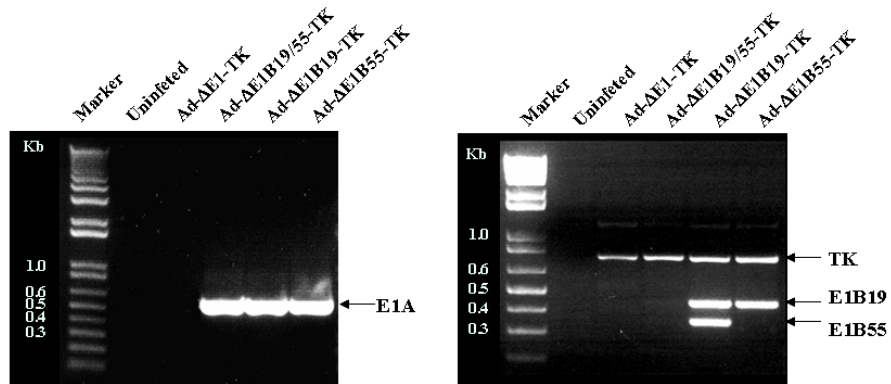


Figure 2. Characterization of E1 mutant adenoviruses expressing HSV-TK gene. (A) The E1 region specific primer sets corresponding to E1A, E1B 19kDa, E1B 55kDa, and HSV-TK are shown below the diagram of E1 region of adenovirus genome, and each expected size of PCR products is 479 bp, 429 bp, 338 bp, and 700 bp respectively. (B) PCR product analysis of Ad- Δ E1-TK, Ad- Δ E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, and Ad- Δ E1B55-TK adenoviruses. Left, size marker, 1 kb DNA ladder (GIBCO). The presence of each PCR product verified the deletion of the genes and the insertion of HSV-TK gene.

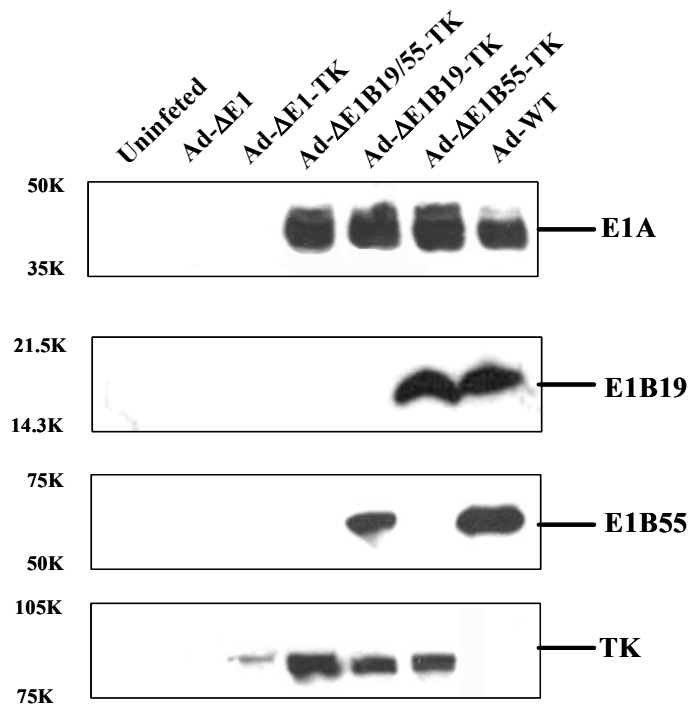


Figure 3. Detection of the E1A, E1B 19kDa, E1B 55kDa and HSV-TK protein by Western blot analysis. Forty-eight hours after infection, total protein from C33A cells infected with Ad-ΔE1, Ad-ΔE1-TK, Ad-ΔE1B19/55-TK, Ad-ΔE1B19-TK, Ad-ΔE1B55-TK, or Ad-WT at a dose of 20 MOI were analyzed with anti-E1A, anti-E1B 19kDa, or anti-E1B 55kDa, anti-HSV-TK antibody as described in Materials and Methods.

이에 따른 단백질 발현 양상은 제작한 재조합 아데노바이러스들이 본 연구의 목적에 맞게 제작되었음을 의미한다.

2. 세포 살상능 비교 검증

HSV-TK 유전자를 발현하는 4종류의 E1 유전자 변이체 아데노바이러스들의 종양 세포 살상능을 비교 검증하기 위하여, 여러 종류의 암세포주들에 감염시켜 세포 살상 정도를 관찰하였다. 사용된 인체 암세포주들로서는 폐암 세포주(A549), 인체 간암 세포주(Hep1), 자궁암 세포주(C33A)들이며, 이들을 각각 0.1, 1, 5, 10, 20 그리고 50 MOI의 역가로 감염시켰다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이, 음성 대조군인 증식 불능 아데노바이러스인 Ad- Δ E1로 감염된 암세포주들에서는 아데노바이러스의 증식에 따른 세포 살상 효과가 전혀 관찰되지 않았으며, Ad- Δ E1-TK에서도 마찬가지로 세포 살상 효과가 관찰되지 않았다. 그러나 증식 가능 바이러스인 Ad- Δ E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, 그리고 Ad- Δ E1B55-TK에 의해 감염된 암세포주들에서는 바이러스 증식에 따른 세포 살상이 유도되었다. 투여된 바이러스의 역가로 비교할 때, Ad- Δ E1B19-TK는 실험에 사용된 모든 종류의 암세포들에서 다른 증식 가능 아데노바이러스들보다 높은 살상능을 유도하였다.

3. 증식 가능 아데노바이러스와 ganciclovir 병용 치료에 의한 암세포 살상능 상승효과 비교 검증

증식 가능 아데노바이러스와 전약제인 ganciclovir(GCV)의 병용 치료에 의한 암세포 살상능을 정량화하기 위해, A549, Hep1, C33A 세포주에 Ad- Δ E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, Ad- Δ E1B55-TK와 대조군 아데노바이러스인 Ad- Δ E1-TK로 각각 감염시

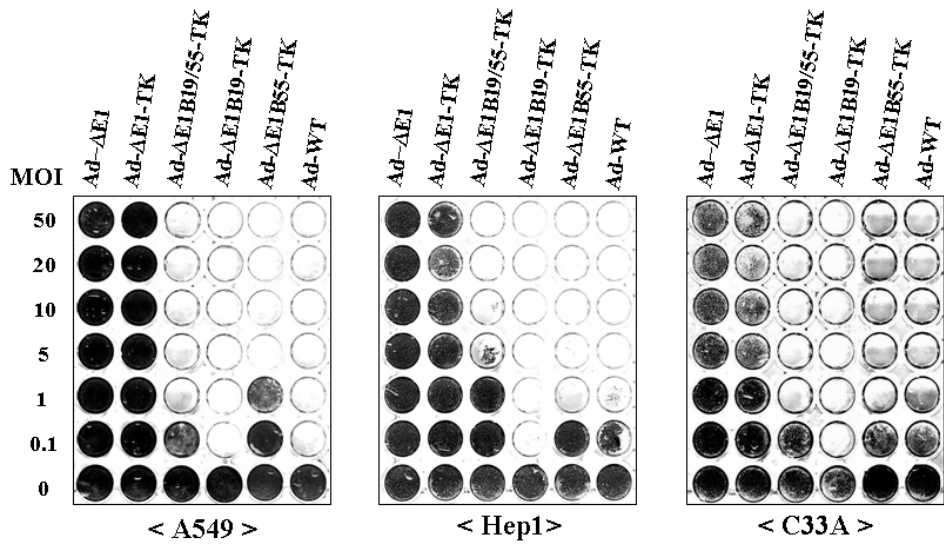


Figure 4. Cytopathic effects of recombinant adenoviruses expressing HSV-TK *in vitro*. Monolayers of cells were infected with different viruses, as indicated. Replication-incompetent adenovirus, Ad-ΔE1, and wild type adenovirus Ad-WT served as negative and positive controls, respectively. When cells infected with any kind of adenoviruses were completely lysed at an MOI of 0.1, cells remaining on the plates were fixed and stained with crystal violet.

킨 후 GCV를 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 그리고 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 뒤 4일 후에 살아남은 세포의 생존율을 측정하였다(Fig. 5). 전약제인 GCV에 의한 암세포주의 독성을 알아보기 위하여 암세포주에 재조합 아데노바이러스를 감염시키지 않고 GCV만을 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 그리고 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하였다. 각 바이러스 감염에 따른 세포 생존율은 각각의 세포주에 바이러스 또는 GCV를 처리하지 않은 경우의 세포 생존율을 100%로 환산하여 상대 비교하였다. 아데노바이러스를 처리하지 않고 GCV만 처리한 세포주에서는 GCV 농도에 따라서 80~100%의 세포 생존율을 보여주었다. 증식 불능 아데노바이러스인 Ad- $\Delta\text{E1-TK}$ 을 처리한 모든 세포주에서는 바이러스 증식에 따른 세포 살상은 유도되지 않았지만 HSV-TK와 GCV 반응에 의한 세포 살상이 유도되어 바이러스를 처리하지 않고 GCV만 처리한 세포주에 비해 낮은 세포 생존율을 보여주었으며, 특히 GCV 농도에 의존적으로 세포 살상이 유도되었다. HSV-TK 유전자를 발현하는 증식 가능 아데노바이러스들을 투여한 암세포주들의 경우에는, GCV의 농도가 증가함에 따라서 아데노바이러스에 의한 세포 사멸이 크게 증가하였다. 특히, Ad- $\Delta\text{E1B19/55-TK}$ 의 GCV 병용 투여에 따른 세포살상능이 Ad- $\Delta\text{E1B55-TK}$ 보다 우수하였으며, 또한 Ad- $\Delta\text{E1B19-TK}$ 는 실험에 사용된 모든 세포주들에서 가장 우수한 세포 살상을 유도하였다. 이러한 결과들로, 증식 불능 아데노바이러스인 Ad- $\Delta\text{E1-TK}$ 와 GCV를 병용 처리한 경우의 세포 살상 효과보다 증식 가능 아데노바이러스인 Ad- $\Delta\text{E1B19/55-TK}$, Ad- $\Delta\text{E1B55-TK}$, 또는 Ad- $\Delta\text{E1B19-TK}$ 와 GCV를 병용 처리한 경우의 세포 살상 효과가 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 특이하게도 Ad- $\Delta\text{E1B19-TK}$ 아데노바이러스의 경우에는, GCV와 함께 병용 처리하였을 때의 세포 살상능이 아데노바이러스만 처리한 경우에 비해 감소하였는데, 이는 GCV의 병용 처리에 따른 바이러스 증식의 감소로 Ad- $\Delta\text{E1B19-TK}$ 의 강력한 세포 살상능이 약화되었을 것으로 유추된다. 이를 보다 체계적으로

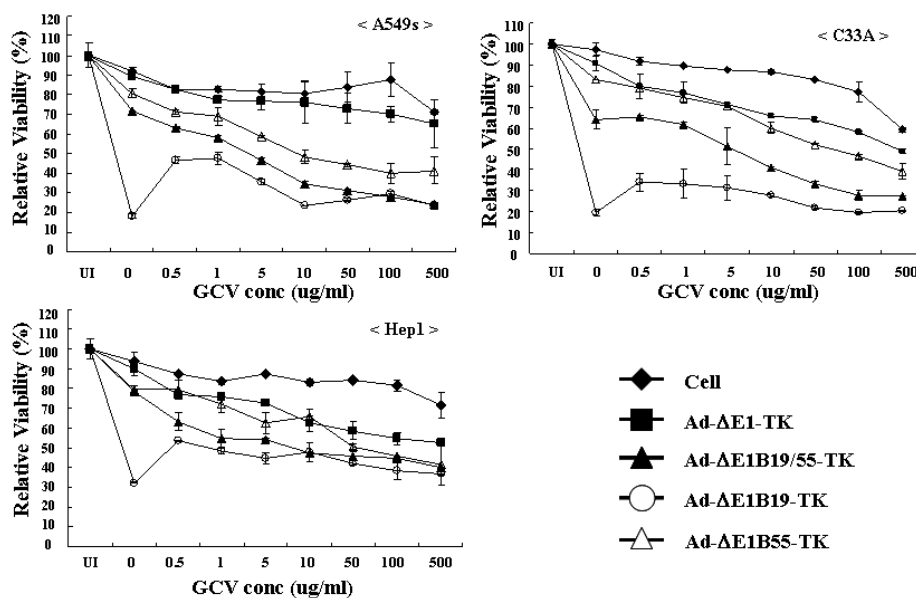


Figure 5. *In vitro* cytotoxicity of recombinant adenoviruses expressing HSV-TK combined with GCV treatment. Monolayers of cancer cells were infected with Ad-ΔE1-TK (■), Ad-E1B19/55-TK (▲), Ad-ΔE1B19-TK (○), or Ad-ΔE1B55-TK (△) at an MOI of 3 (C33A, A549) and 2 (Hep1). Untreated cells were served as a negative control (◆). Infected cells were then cultured with various concentrations of GCV for 4 days and the viability of the cells were estimated by the MTT assay. Mean values and standard errors of three or more experiments, each performed in triplicate, are shown.

검증하기 위하여, GCV의 병용 투여에 따른 증식 가능 아데노바이러스의 증식능 변화를 다음 실험을 통하여 알아보았다.

4. GCV와의 병용 투여에 따른 증식 가능 아데노바이러스의 증식능 비교 검증

HSV-TK의 전약제인 GCV를 처리한 경우의 증식 가능 아데노바이러스들의 종양 세포 내 증식능 변화를 검증하기 위해, A549 세포주에 Ad- Δ E1-TK, Ad- Δ E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, 또는 Ad- Δ E1B55-TK를 5 MOI로 각각 감염시키고 24시간 후 GCV(50 μ g/ml)를 처리한 뒤 1일, 3일, 그리고 5일 후에 증식된 아데노바이러스를 수득하였다(Fig. 6). GCV를 처리하지 않은 대조군들을 비교해본 결과, Ad- Δ E1B19-TK 바이러스의 생산능이 가장 우수하였으며(바이러스 투여 후 5일, 2.40×10^7 PFU), Ad- Δ E1B55-TK(바이러스 투여 후 5일, 2.40×10^5 PFU), 그리고 Ad- Δ E1B19/55-TK(바이러스 투여 후 5일, 4.79×10^4 PFU)의 순으로 바이러스의 생산능이 우수하였다. 그러나 증식 불능 아데노바이러스(Ad- Δ E1-TK)의 경우에는 바이러스의 증식이 전혀 일어나지 않아 세포 배양시간이 증가함에 따라 바이러스의 총량이 감소함을 확인할 수 있었다. GCV를 병용 투여한 경우의 아데노바이러스 증식능을 비교해 보면, Ad- Δ E1B19-TK의 바이러스 총 생산능이 여전히 가장 높게 나타났지만, GCV 병용 투여로 인하여 바이러스의 생산능이 2500배 이상 크게 감소하였음을 알 수 있다(바이러스 투여 후 5일, 9.55×10^3 PFU). 이러한 결과는 앞서 진행한 실험(Fig. 5)에서 보여주었던 GCV 병용 투여에 따른 Ad- Δ E1B19-TK 바이러스의 세포 살상능 감소 결과를 뒷받침 해줄 수 있을 것으로 생각된다. 하지만, Ad-E1B55-TK와 Ad-E1B19/55-TK 바이러스와 GCV를 병용 처리한 경우에는, GCV를 처리하지 않은 경우보다 낮은 증식능을 나타내어 바이러스의 총 생산량이 각각 4.79×10^3 PFU과

A

GCV (-)	Total Viral Production (PFU)		
	1 Days	3 Days	5 days
UI	0	0	0
Ad- Δ E1-TK	4.79E+03	1.51E+03	7.59E+02
Ad- Δ E1B19/55-TK	2.40E+04	9.55E+03	4.79E+04
Ad- Δ E1B19-TK	3.02E+07	1.51E+07	2.40E+07
Ad- Δ E1B55-TK	1.20E+05	9.55E+04	2.40E+05

GCV (+)	Total Viral Production (PFU)		
	1 Days	3 Days	5 days
UI	0	0	0
Ad- Δ E1-TK	3.80E+03	9.55E+01	2.40E+02
Ad- Δ E1B19/55-TK	1.20E+04	1.91E+03	3.02E+03
Ad- Δ E1B19-TK	1.91E+04	7.59E+03	9.55E+03
Ad- Δ E1B55-TK	9.55E+03	1.51E+03	4.79E+03

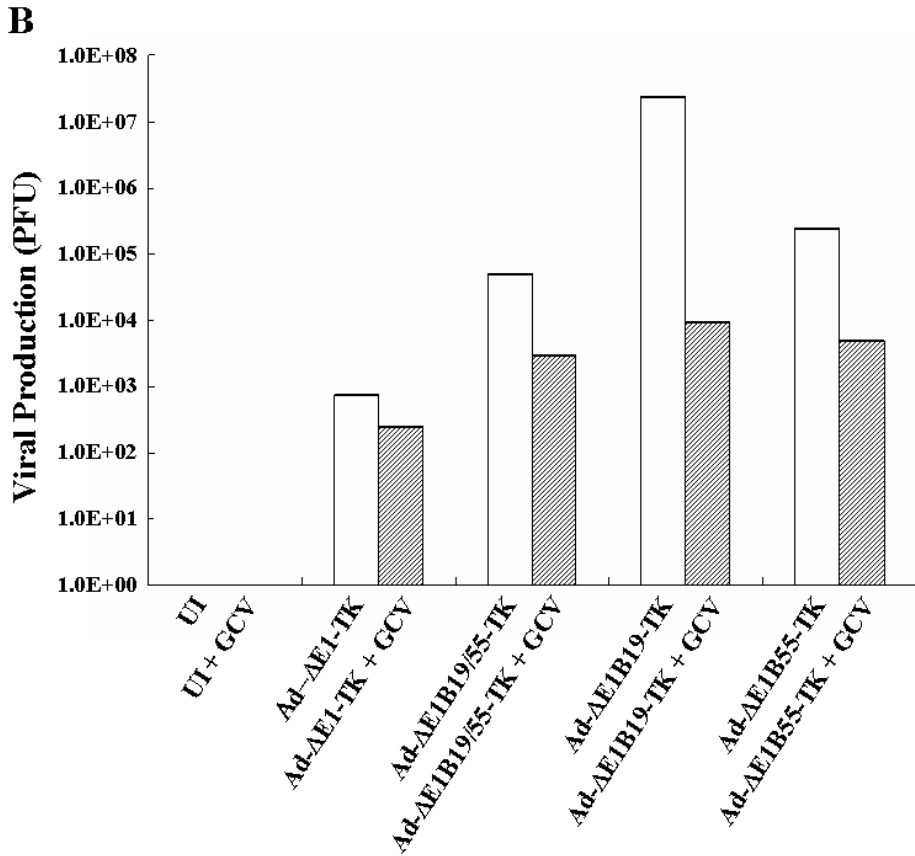


Figure 6. Viral production assay. (A) Monolayers of A549 cells were infected with adenoviruses at an MOI of 5. Twenty-four hours after infection of the Ad-ΔE1-TK, Ad-E1B19/55-TK, Ad-ΔE1B19-TK, or Ad-ΔE1B55-TK, infected cells were treated with or without increasing doses of GCV. Each virus present in cell and supernatant was then extracted at the indicated days post-infection, and viral titers were determined by limiting titration assay. (B) Total viral production of each virus with (hatched columns) or without (open columns) GCV (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 5 days post infection was plotted on the graph.

3.02×10^3 PFU로서 GCV를 병용 처리하지 않은 경우에 비해 약 15~50배 정도 감소하여, 그 감소 정도가 Ad- Δ E1B19-TK에 비해 크게 낮음을 알 수 있다.

5. 생체 내 항종양 효과 비교 검증

HSV-TK 유전자를 발현하는 4종류의 E1 유전자 변이체 아데노바이러스들과 GCV의 병용 투여에 따른 생체 내 항종양 효과를 비교 검증하기 위하여, 누드마우스에 형성된 A549 폐암 또는 C33A 인체 자궁암(xenograft model)에 Ad- Δ E1-TK, Ad- Δ E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, 또는 Ad- Δ E1B55-TK 바이러스(1×10^8 PFU)를 각각 이틀 간격으로 3회 종양 내로 투여한 후 복강 내로 GCV를 100 mg/kg의 농도로 12시간 간격으로 14일 동안 처리하여 종양의 성장을 관찰하였다(Fig. 7). 인체 자궁암 C33A에서는 음성 대조군인 PBS로 주사한 경우에 투여 후 51일경에 종양의 크기가 약 2600 mm³이상으로 종양이 매우 빠르게 성장한 반면에, HSV-TK 유전자를 발현하는 아데노바이러스와 GCV를 병용 투여한 경우에는 종양의 성장이 크게 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 특히, Ad- Δ E1B19-TK 아데노바이러스와 GCV를 병용 투여한 경우에는 바이러스 투여 후 51일 경에 종양의 크기가 13.95 ± 11.11 mm³로 매우 높은 항종양효과를 확인할 수 있었다. 또한, Ad- Δ E1B19/55-TK와 Ad- Δ E1B55-TK 바이러스와 GCV를 병용 투여한 경우에도 종양의 크기가 각각 39.39 ± 13.48 mm³ 와 119.68 ± 50.00 mm³ 로 매우 우수한 항종양 효과가 유도되었다. 이에 비하여 HSV-TK를 발현하는 증식 불능 아데노바이러스인 Ad- Δ E1-TK와 GCV를 병용 투여한 경우에는 HSV-TK를 발현하는 증식 가능 아데노바이러스와 GCV를 함께 투여한 경우에 비해 현저히 낮은 항종양 효과가 유도되어, 증식 가능 아데노바이러스에 의한 HSV-TK의 발현으로 인한 항종양 효과가 매우 우수함을 알 수 있다. 이러한

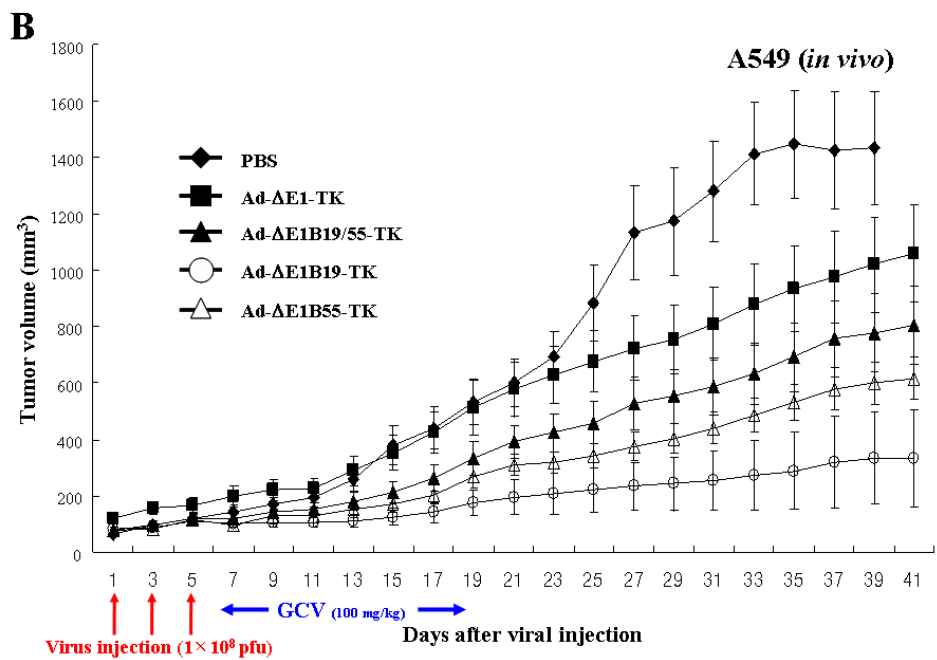
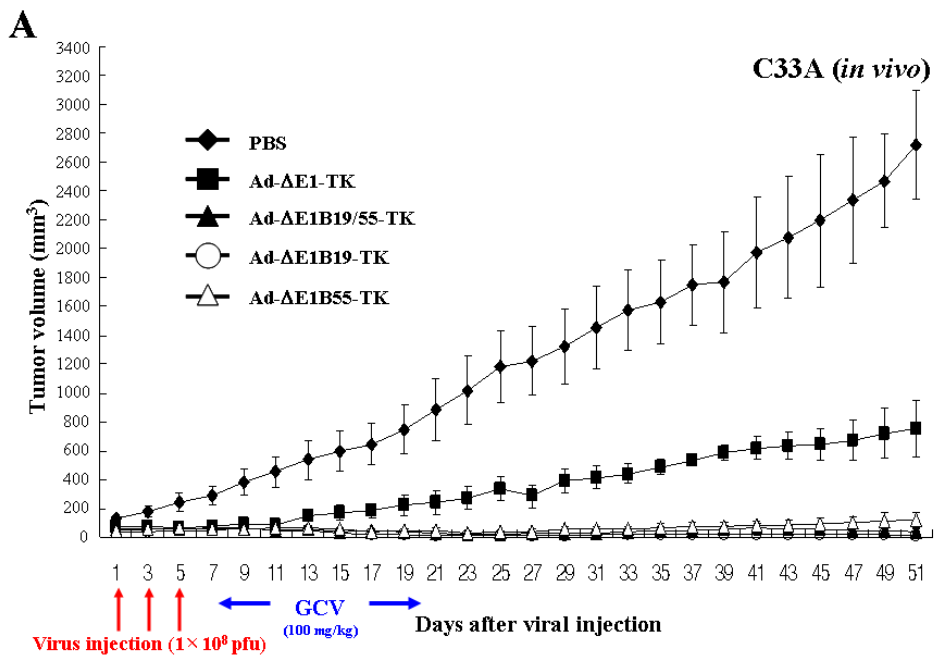


Figure 7. Effects of recombinant adenoviruses expressing HSV-TK against C33A and A549 tumors in male athymic nude mice. Tumors were established by subcutaneous implantation of 1×10^7 cells and allowed to grow to an average size of $60 \sim 70 \text{ mm}^3$. Animals with established tumors were randomized into five treatment groups of four animals (C33A) and seven animals (A549) each and treatment was initiated (day 1). Each group was treated with a single intratumoral injection with 1×10^8 PFU of Ad- Δ E1-TK, Ad-E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, or Ad- Δ E1B55-TK on days 1, 3, and 5 (vertical arrows), and followed by GCV administration intraperitoneally twice a day for 14 days (days 6~19). Tumor growth was monitored on a 2- to 3-day interval by measuring the short length (w) and long length (L) of the tumor. Tumor volume was estimated on the basis of the following formula: $\text{volume} = 0.523 \times Lw^2$

Ad- Δ E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, 또는 Ad- Δ E1B55-TK의 탁월한 항종양 효과가 다른 인체 종양모델에서도 적용될 수 있는지 알아보기 위해 A549 xenograft에서 상기의 방법과 동일한 방법으로 항종양 효과를 검증하였다. Figure 7.B에서 볼 수 있듯이, 음성 대조군인 PBS를 투여한 군에 비해서 HSV-TK를 발현하는 아데노바이러스인 Ad- Δ E1-TK, Ad- Δ E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, 또는 Ad- Δ E1B55-TK를 투여한 군에서 항종양 효과가 관찰되었으며, HSV-TK를 발현하는 3 종류의 E1B 변이체 증식 가능 아데노바이러스와 GCV와 병용 투여에 따른 항종양 효과가 증식 불능 아데노바이러스와 GCV와의 병용 투여에 따른 항종양 효과보다 월등히 우수하였다. 특히, C33A xenograft에서와 마찬가지로 Ad- Δ E1B19-TK와 GCV를 병용 투여한 경우에 항종양 효과가 가장 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었으며, Ad- Δ E1B19-TK 바이러스를 투여 받은 총 7마리의 생쥐들 중 1마리의 생쥐에서 종양이 완전히 사라졌다.

IV. 고찰

종양 특이적 살상 아데노바이러스가 새로운 암유전자 치료법으로 대두된 이후 현재 이를 이용한 임상 실험들이 활발히 진행되고 있다. 암세포 내에서 복제하여 주변의 암세포로 확산하여 세포 살상 효과가 도미노 현상과 같이 계속 퍼져나갈 수 있는 잇점이 있는 종양 특이적 살상 아데노바이러스는 기존의 일 세대 아데노바이러스인 증식 불능 아데노바이러스보다 유전자 전달효율이 우수하나, 야생형 아데노바이러스에 비해 암세포 살상력이 현저히 낮은 단점이 있다²⁷. 최근에 이루어진 여러 임상 실험에서 종양 특이적 살상 아데노바이러스가 인체에 안전하며 항종양 효과를 유도한다는 것이 밝혀졌지만, 낮은 암세포 살상능으로 고농도의 아데노바이러스를 인체에 반복적으로 투여하여야 한다는 문제점이 제기되고 있다²⁸. 이러한 문제점을 극복하기 위한 방안으로 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 dl1520 아데노바이러스와 5-FU 등과 같은 항암제를 병용 투여한 결과, 각각을 단독 투여한 경우에 비하여 세포 살상능이 현저히 향상되고 암조직 내의 바이러스의 확산이 증가되었음이 보고되었다²⁹. 또한, 암 유전자 치료법의 항종양 효과를 보다 증대시키기 위한 방안으로, 억제 감수성 유전자인 HSV-TK를 아데노바이러스에 도입하여 세포 살상을 유도하는 연구들이 활발하게 진행되었으며, 이를 이용한 제 2단계 임상 시험에서도 긍정적인 결과들이 보고된 바 있다³⁰.

증식 가능 아데노바이러스를 이용한 유전자 치료의 효과적인 항종양 효과를 개선하기 위해서는 빠른 속도로 성장해 나가는 종양에 대해 보다 빠른 바이러스의 증식과 효과적인 살상 효과를 유발시킴으로써 이를 극복할 수 있어야 한다. 낮은 항종양 효과를 극복하기 위한 방안으로 E1B 19kDa 유전자가 소실된 증식 가능 아데노바이러스를 이용하는 방법이 시도되었는데³¹, 아데노바이러스의 E1B 유전자인

E1B 19kDa은 강력한 세포고사(apoptosis) 억제제로서 아데노바이러스의 E1A 또는 p53에 의하여 유도되는 세포고사를 억제시키는 역할을 하므로, E1B 19kDa 유전자의 소실은 바이러스 증식에 따른 세포 살상과 동시에 세포 고사를 함께 유도할 수 있어 증식 가능 아데노바이러스의 세포 살상능을 증가시킬 수 있다. 또 다른 낮은 항종양 효과를 극복하기 위한 방법으로 E1B 55kDa 유전자가 소실된 아데노바이러스를 이용하는 방법이 있다. 아데노바이러스 초기 발현 유전자인 E1B 55kDa은 종양 억제 유전자인 p53과 결합하여 p53의 기능을 억제하는 역할 뿐만 아니라 아데노바이러스의 단백질 합성에도 관여하여 바이러스 복제에도 필요한 유전자이다. E1B 55kDa 유전자가 소실된 아데노바이러스는 p53 status에 의존적인 세포 살상에 따른 암세포 특이적 증식 및 살상을 유도할 수 있다. 즉, E1B 55kDa 유전자가 소실된 아데노바이러스를 정상 세포에 감염시키면 아데노바이러스에 의해 이들 세포에 있는 p53의 비활성화를 유도할 수 없어 바이러스의 증식이 억제되지만, p53이 유전적으로 변형되어 있거나 기능이 억제되어 있는 여러 암세포들에서는 바이러스의 증식이 활발하게 일어나게 되어 궁극적으로 암세포 특이적 살상을 유도하게 된다.

이러한 가능성을 보다 체계적으로 검증하기 위해서 본 연구에서는 약제 감수성 유전자 HSV-TK를 가지는 3종류의 E1B 변이체 증식 가능 아데노바이러스인 Ad-ΔE1B19/55-TK, Ad-ΔE1B19-TK 그리고 Ad-ΔE1B55-TK와 증식 불능 아데노바이러스인 Ad-ΔE1-TK를 이용하여 GCV와 함께 투여하였을 때의 세포 살상 상승효과와 아데노바이러스의 증식능 및 생체 내 항종양 효과를 비교 검증해 보았다. 세포 살상능을 가지적으로 확인할 수 있는 CPE assay와 세포 살상능을 정량화할 수 있는 MTT assay를 통해 증식 불능 아데노바이러스인 Ad-ΔE1-TK보다 증식 가능 아데노바이러스인 Ad-ΔE1B19/55-TK, Ad-ΔE1B19-TK, 그리고 Ad-ΔE1B55-TK에 의해 세

포 살상 효과가 높게 유도되는 것을 확인할 수 있었으며, 그 중에서도 Ad- Δ E1B19-TK가 가장 높은 세포 살상을 유도함을 확인할 수 있었다. MTT assay에서는 아데노바이러스를 단독으로 처리하였을 때 보다 전약제인 GCV를 병용 투여하였을 때 세포 살상이 상승적으로 증가함을 확인하였다. 그러나 Ad- Δ E1B19-TK 아데노바이러스의 경우에는, GCV와 함께 병용 처리하였을 때의 세포 살상능이 아데노바이러스만 처리한 경우에 비해 감소하였는데, 이는 GCV의 병용 처리에 따라 바이러스 증식능이 크게 감소하고, 이로 인하여 Ad- Δ E1B19-TK의 강력한 세포 살상능이 약화되었음을 GCV 병용 투여한 경우와 GCV를 병용 투여하지 않은 경우에서의 바이러스 증식능 비교 실험을 통하여 확인할 수 있었다. 또한, HSV-TK 유전자를 발현하는 4종류의 E1 유전자 변이체 아데노바이러스들과 GCV의 병용 투여에 따른 생체 내 항종양 효과를 비교한 결과, HSV-TK를 발현하는 증식 가능 아데노바이러스와 GCV를 병용 투여한 경우에는 HSV-TK를 발현하는 증식 불능 아데노바이러스인 Ad- Δ E1-TK와 GCV를 함께 투여한 경우에 비해 현저히 높은 항종양 효과를 유도하는 것을 관찰할 수 있었다.

아데노바이러스와 GCV의 병용 투여에 의한 상승작용의 효과는 이전의 연구들에 의해 보고되었고, 본 연구를 통해서도 그 효과를 재확인할 수 있었다. GCV는 독성을 가지지 않은 전약제로서 아데노바이러스 내에 포함되어 있는 HSV-TK에 의해서 인산화됨으로서 DNA 합성을 억제, 세포 살상능을 가지게 된다³². 이 전략의 중요한 장점은 HSV-TK 유전자가 이입되지 않은 주위의 암세포도 같이 죽이는 “bystander effect”를 나타낸다는 것인데, 현재 암치료를 위한 유전자 치료법의 가장 큰 문제점인 모든 암세포에 일일이 치료 유전자를 이입할 수 없다는 결점을 부분적으로 보완할 수 있다는 점에서 중요한 의미를 갖는다. 최근에 제시된 또 하나의 중요한 작용기전은 항

암 면역기능의 유발이다. HSV-TK/GCV에 의해 항암 효과가 관찰되는 종양 주위로 macrophage, CD4+, CD8+ lymphocyte 들이 침윤되는 것이 관찰되고 이 과정에서 TNF, IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ , GM-CSF, B7의 발현이 증가된다고 보고되어 항종양 면역기능의 개입 시사되고 있다³²⁻³³.

본 연구에서는 E1B 19kDa과 E1B 55kDa 유전자가 각각 다르게 조합된 3종류의 E1B 변이체 증식 가능 아데노바이러스인 Ad- Δ E1B19/55, Ad- Δ E1B19, 그리고 Ad- Δ E1B55 에 HSV-TK를 삽입함으로써, 더욱 증가된 세포 살상능을 가진 증식 가능 재조합 아데노바이러스들을 제작하고 이들의 전체적인 효율성을 평가하였다. 그 결과, 아데노바이러스의 증식이 불가능하며 1회성의 감염만 가능한 Ad- Δ E1-TK 바이러스에 비하여 증식 가능 아데노바이러스들인 Ad- Δ E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, 그리고 Ad- Δ E1B55-TK과 GCV 병용 투여에 의한 세포 살상능이 현저히 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 나아가, 암치료에 필요한 아데노바이러스의 투여량을 줄일 수 있어 바이러스로 인한 독성과 숙주의 면역반응을 감소시켜 유전자 치료의 안전성을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는, 여러 종류의 E1B 변이체 증식 가능 아데노바이러스의 암세포 살상능을 배가시키기 위한 방안으로, 각각의 E1B 변이체 아데노바이러스에 약제 감수성 유전자인 HSV-TK 유전자를 도입하여 Ad- Δ E1B19-TK, Ad- Δ E1B55-TK, Ad- Δ E1B19/55-TK를 제작하였으며, 이와 더불어 E1이 소실된 증식 불능 아데노바이러스에 HSV-TK가 도입된 Ad- Δ E1-TK를 제작하였다. 제작된 4종류의 변이체 아데노바이러스들의 종양 세포 살상능을 비교 검증한 결과(CPE assay), 증식 가능 바이러스인 Ad- Δ E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, 그리고 Ad- Δ E1B55-TK에 의해 감염된 암세포주들에서는 바이러스 증식에 따른 세포 살상이 유도되었으며, 투여된 바이러스의 역가로 비교할 때 Ad- Δ E1B19-TK의 세포 살상능이 가장 높았다. 또한, GCV의 병용 투여에 의한 상승적 세포 살상능을 검증하기 위하여 수행한 MTT assay 결과, GCV의 농도가 증가함에 따라 HSV-TK 유전자를 발현하는 아데노바이러스들의 세포 살상능이 크게 증가하였으며, 특히 증식 불능 아데노바이러스인 Ad- Δ E1-TK에 비하여 증식 가능 아데노바이러스와 GCV를 병용 처리한 경우의 세포 살상 효과가 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었다. HSV-TK 유전자를 발현하는 4종류의 E1 유전자 변이체 아데노바이러스들과 GCV의 병용 투여에 따른 생체 내 항종양 효과를 비교한 결과, Ad- Δ E1-TK와 GCV를 병용 투여한 경우에는 HSV-TK를 발현하는 증식 가능 아데노바이러스와 GCV를 병용 투여한 경우에 비해 현저히 낮은 항종양 효과가 유도되었으며, 특히 Ad- Δ E1B19-TK와 GCV를 병용 투여한 경우에 항종양 효과가 가장 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다.

VI. 참고문헌

1. Belmont JW, Henkel-Tiggles J, Chang SM, Wager-Smith K, Kellems RE, Dick JE, Magli MC, Phillips RA, Bernstein A, Caskey CT. Expression of human adenosine deaminase in murine haematopoietic progenitor cells following retroviral transfer. *Nature*. 1986;Jul;24-30;322(6077):385-387
2. Gaunitz F, Papke M, Gebhardt R. Transient transfection of primary cultured hepatocytes using CaPO₄/DNA precipitation. *Biotechniques*. 1996;May;20(5):826-830, 832
3. Anderson WF, Blaese RM, Culver K. The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to Consider response with clinical protocol, July 6, 1990. *Hum Gene Ther*. 1990;Fall;1(3):331-362
4. Anderson WF. et al. : Human gene therapy. *Science* 1992;56:808-813
5. Mullen CA. et al. : Molecular analysis of T lymphocyte-directed gene therapy for adenosine deaminase deficiency: long-term expression in vivo of genes introduced with a retroviral vector. *Hum Gene Ther* 1996;7:1123-1129
6. Kay MA. et al. : Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 2000;24:257-261
7. Isner M. et al. : Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999;103:1231-1236
8. Bischoff JR, Kim. DH, Williams A, Heise. C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaey A, and McCormick F. An adenovirus mutant that replicates selectively

- in p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996;274:373-376.
9. Zhang W. Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther* 1999;6(2):113-138.
 10. Heise C. et al. : ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med* 1997;3:639-645.
 11. Boulakia CA, Chen G, Ng FW, Teodoro JG, Branton PE, Nicholson DW, Poirier GG, Shore GC. Bcl-2 and adenovirus E1B 19kDa protein prevent E1A-induced processing of CPP32 and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase. *Oncogene* 1996;12:529-535.
 12. Debbas M, White E. Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev* 1993;7:546-554.
 13. Rao L, Debbas M, Sabbatini P, Hockenbery D, Korsmeyer S, White E. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19kDa and Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:7742-7746.
 14. Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, and White E. The E1B19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev* 1996;10:461-477.
 15. Huang DC, Cory S, Strasser A. Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B 19kDa are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene* 1997;14:405-414.
 16. Sauthoff H, Heitner S, Rom WN, Hay JG. Deletion of the adenoviral E1B-19 kD gene enhances tumor cell killing of a

- replicating adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 2000;11:379-388.
17. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
 18. 김주항, 문유선, 신동환, 송재진, 공수정, 라선영, 김수경, 정숙정, 정현철, 노재경, 민진식, 김병수: 인체위암 세포주에 retroviral vector를 이용한 p53 종양 억제 유전자의 형질도입에 관한 연구. *대한암학회지* 1997;29:754-764.
 19. Zwiebel JA, Su N, Macpherson A, Davis T, Ojeifo J. The gene therapy of cancer: Transgenic immunotherapy. *semin Hematol* 1993;30:119-128.
 20. Mukhopadhyay T, TainskY M, cavender AC, Rom JA. Specific inhibition of k-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA. *Cancer Res* 1991;51:1744-1748.
 21. Huber BE et al. : Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: an innovate approach for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8039-8043
 22. Moolten FL.: Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 1986;46:5276-5281
 23. Borrelli E. et al.: Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:7572-7576
 24. Ezzeddine ZD. et al.: selective killing of glioma cells in culture and *in vivo* by retrovirus transfer of me herpes simplex virus thymidine kinase gene. *New Biol* 1991;3:608-614
 25. Kenneth R. Rogulski, Jae Ho Kim, Sang Hie Kim, and Svend O. Freytag. Glioma cells transduced with an Escherichia coli CD/HSV-1 TK fusion gene exhibit enhanced metabolic suicide and radiosensitivity. *Hum Gene Ther.* 1997;1;8(1):73-85.

26. Freeman SM et al. The "Bystander effect" tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993;53:5274
27. Danthinne X, Imperiale MJ Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther* 2000;Oct;7(20):1707-1714
28. Worgall S. et al. : Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum Gene Ther* 1997;8:37-44
29. Habib NA, Sarraf CE, Mitry RR, Havlik R, Nicholls J, Kelly M, Vernon CC, Gueret-Wardle D, El-Masry R, Salama H, Ahmed R, Michail N, Edward E, Jensen SL. E1B-deleted adenovirus (dl1520) gene therapy for patients with primary and secondary liver tumors. *Hum Gene Ther.* 2001;Feb 10;12(3):219-226
30. Klatzmann D, Valery CA, Bensimon G, Marro B, Boyer O, Mokhtari K, Diquet B, Salzmann JL, Philippon J. A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma. Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma. *Hum Gene Ther.* 1998;20;9(17):2595-2604.
31. Kim Js, Cho JY, Kim JH, Jung KC, Yun CO Evaluation of E1B gene-attenuated replicating adenoviruses for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 2002;Sep;9(9):725-736
32. Agard C, Ligeza C, Dupas B, Izembart A, El Kouri C, Moullier P, Ferry N. Immune-dependent distant bystander effect after adenovirus-mediated suicide gene transfer in a rat model of liver colorectal metastasis. *Cancer Gene Ther.*

2001;Feb;8(2):128-136

33. Miles BJ, Shalev M, Aguilar-Cordova E, Timme TL, Lee HM, Yang G, Adler HL, Kerns K, Pramudji CK, Satoh T, Gdor Y, Ren C, Ayala G, Wheeler TM, Butler EB, Kadmon D, Thompson TC. Prostate-specific antigen response and systemic T cell activation after in situ gene therapy in prostate cancer patients failing radiotherapy. *Hum Gene Ther.* 2001;11;12(16):1955-1967.

Abstract

Enhanced cell killing effect of E1 modified adenoviruses expressing HSV-TK suicide gene

Dong Hyeon KO

*Department of Medical Science
The graduate School, Yonsei University*

(Directed By Professor Chae-Ok Yun)

Suicide gene therapy has proved to be successful in enhancing the therapeutic index by sensitizing genetically modified tumor cells to prodrug. Recent clinical trials with Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase (HSV-TK) gene therapy using E1-deleted replication-incompetent virus have shown encouraging results, but with limited efficacy. Replication-incompetent virus limits their ability to infect additional cells subsequent to the initial infection event. Although the bystander effect increases the degree of tumor cell killing, further strategies are needed to enhance the therapeutic efficacy. We have previously demonstrated that the cytolytic potency of replication-competent adenoviruses with different combination of E1B genes differed significantly depending on the presence or deletion of E1B 55kDa and E1B 19kDa function (Kim JS. et al. Cancer Gene Therapy). To combine the advantages of

the suicide gene approach with that of replicating adenoviruses, we have developed replicating adenoviral vectors harboring HSV-TK, generating Ad- Δ E1B19/55-TK, Ad- Δ E1B19-TK, and Ad- Δ E1B55-TK adenoviruses. The expression of HSV-TK was assessed by western blot and confirmed by measuring sensitivity to ganciclovir (GCV). The cytotoxicity of the combination therapy with replicating adenoviruses (Ad- Δ E1B55-TK or Ad- Δ E1B19/55-TK) and GCV was dramatically increased compared with replicating adenoviruses alone or replication-incompetent adenovirus expressing HSV-TK (Ad- Δ E1-TK). In contrast, the cytotoxicity of the combination therapy with Ad- Δ E1B19-TK and GCV was significantly reduced when compared to the treatment with Ad- Δ E1B19-TK alone. In addition, the total viral production of Ad- Δ E1B19-TK in the presence of GCV was significantly reduced. Taken together, these results suggest that the inhibition of viral replication by the HSV-TK/GCV system counterbalance the cytotoxicity of the most potent replicating adenovirus among E1B mutant replicating adenoviruses, Ad- Δ E1B19-TK. In human cervical cancer (C33A) and lung cancer (A549) xenograft models, tumors were injected directly with each replication-competent adenovirus expressing HSV-TK or with Ad- Δ E1-TK, along with PBS as a control. Animals treated with Ad- Δ E1-TK with GCV had some reduction in tumor growth compared to animals that were injected with PBS only. All replicating adenoviral vectors were more efficacious than Ad- Δ E1-TK with GCV treatment. In summary, these data indicate that the suicide gene approach with replicating adenoviruses elicits more enhanced anti-tumor effect than that with replication-incompetent adenovirus.

Key Words : suicide gene therapy, HSV-TK, ganciclovir (GCV),
5-FC, replication-competent adenovirus, combination therapy