

전신투여 가능한, HER2 표적지향성,
아데노바이러스의 개발

연세대학교 대학원
의 학 과

손 주 혁

전신투여 가능한, HER2 표적지향성,
아데노바이러스의 개발

지도교수 김 주 항

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2008 년 6 월

연세대학교 대학원

의 학 과
손 주 혁

손주혁의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2008 년 6 월
감사의 글

지금 돌이켜 보면, 김주항 교수님 덕분에 유전자 치료를 처음 접한 것이 2002년이었는데, 학위뿐 아니라 환자진료, 다른 연구과제, 교육 등으로 주마등처럼 지나간 5년 이어선지 남들은 늦각이 학생이라고 하는데 본인에게는 무척이나 짧은 시간이었다는 느낌입니다. 이러한 조그마한 작품이 탄생하기까지 저의 멘토이신 김주항 교수님의 도움은 형언할 길이 없을 것입니다. 지난 8년 동안 존경과 사랑을 드릴 수 있는 분을 만나서 남은 평생도 같은 직장에서 즐겁게 일을 할 수 있다는 점은 저에게 내려진 축복이라고 생각합니다. 많은 학생들 지도 및 연구에 바쁘신 와 중에도 이렇게 본인 과제를 마칠 수 있게 도움을 주신 윤채옥 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 암연구소 실험실의 김평환 학생이 없었으면 이런 감사의 글은 쓸 수도 없었을 것입니다. 참으로 성실하고 인간적인 학생이고 과제 수행 동안 좋은 인연을 맺었다고 생각합니다. 본 과제에 있어서 아데노바이러스에 PEG 및 Herceptin을 결합시키는 공정은 필수적입니다. 이러한 과정에 결정적으로 도움을 주신 함승주 교수님과 박효진, 정유경 학생에게 감사의 마음을 표하고 싶습니다. 자문교수로서 중요한 지적과 더불어 격려를 주신 이재면 교수님, 윤호근 교수님께도 이 자리를 빌어서 감사의 마

음을 전하고 싶습니다.

졸업은 시작이라고 했는데 정말 이제 출발하는 느낌입니다. 강사 1년차 때 “형님요” 하면서 실험을 가르쳐줬던 김재성 박사가 생각납니다. M. D. Anderson에서 좋은 결과가 있기를 바랍니다. 이 자리에 모두 소개는 못하지만 암연구소 학생들과의 추억도 잊지 못할 것입니다. 돌이켜 보면 참으로 소중한 시간들이었습니다. 비록 이제 조그만 과제 하나를 마무리 지어 비록 몸은 여기에 있지만 저의 마음은 향후 어떤 가치 있는 연구를 진행할지에 대한 기대로 가득 차 있습니다. 이렇게 많은 분들의 도움으로 박사학위를 마칠 수 있었듯 앞으로도 많은 분들과 좋은 연구를 진행하여 암 연구에 기여를 해야겠다는 각오를 새로 다지고 있습니다.

아내 김현옥과 아들 손민준에게 축하를 받고 싶고 그 동안 도와줘서 고맙고 사랑한다는 말을 전합니다. 또, 오늘의 제가 있기까지 40년간 믿어주고 도와주신 아버지, 그리고 동생들, 모두에게 감사의 마음을 전합니다. 마지막으로, 너의 적성은 교수이라고 사랑과 격려로 오늘의 저를 만들어주신, 지금은 하늘나라에 계신 어머니 영전에 이 작은 결실을 바치고, 다시 한번 사랑하고, 보고 싶은 저의 마음을 전하고 싶습니다.

<차 례>

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	7
1. 대상 세포주 및 세포배양	7
2. 재조합 아데노바이러스 Ad- Δ E1/GFP와 Relaxin 발현 Ad-mTERT- Δ 19의 생산	8
3. 아데노바이러스, PEG 그리고 Herceptin과의 3차 구조물 제작 및 제작된 Ad-PEG-HER의 정성 및 정량 분석	9
4. Au-Ad-PEG-HER의 제작	11
5. 세포내 GFP 발현 측정	11
6. Herceptin retargeting을 확인하기 위한 competition assay	12
7. MTT assay를 통한 종양 세포 살상능 비교	12
8. 아데노바이러스의 혈중 clearance의 측정	13
9. IL-6 및 중화 항체의 측정	13
10. 생체내 항종양 효과 검증	14
11. 독성연구	14
III. 결과	15

1. PEGylation시의 cross linker들의 효능 비교와 유기용매인 DMSO의 적정 농도의 결정	15
2. PEGylation에 사용되는 cross linker에 따른 유전자 전달 효율 비교	16
3. Ad-PEG-HER conjugate의 정성 분석	17
4. Ad, Ad-PEG, Ad-PEG-HER 바이러스의 세포 내 형질도입 효율 비교	18
5. 복제가능 아데노바이러스를 이용해 생성된 Ad-PEG-HER의 종양 세포 살상 효과 비교 검증	19
6. Her2/neu 과발현 세포주에서의 Ad-PEG-HER의 감염경로 검증	20
7. Ad, Ad-PEG, Ad-PEG-HER의 Pharmacokinetics	21
8. IL-6 및 중화 항체의 측정 결과	22
9. 생체내 항 종양 효과	24
10. 독성연구	25
IV. 고찰	26
V. 결론	30
참고문헌	31
영문요약	39

그림 차례

Figure 1. Generation of Ad-PEG-HER conjugation·····	10
Figure 2. Effects of DMSO on adenovirus infection ·····	15
Figure 3. Transduction efficiencies of PEGylated Ad with different cross-linkers along with different concentrations···	16
Figure 4. Determination of average size of the three particles · ·	17
Figure 5. Transmission Electron Microscopy images of (a) Ad, (b) Ad-PEG, (c) Ad-PEG-HER and (d) Ad-PEG-HER-Au · ·	18
Figure 6. Fluorescence microscopic images of cells followed by the incubation with Ad, Ad-PEG and Ad-PEG- HER in HER2 (+) & (-) cell lines·····	19
Figure 7. MTT assay of the Ad, Ad-PEG, and Ad-PEG-HER using replication competent adenovirus·····	20
Figure 8. Comparison of Ad-PEG-HER transduction efficiency with/without pretreated Herceptin (competition assay) in HER2 (+) cell line ·····	21

Figure 9. Pharmacokinetics of Ad, Ad-PEG and Ad-PEG-HER in BALB/c mice	22
Figure 10. Comparison of serum IL-6 concentration among mice treated with Ad, Ad-PEG and Ad-PEG-HER, respectively	23
Figure 11. Comparison of serum neutralizing Ab concentration among mice treated with Ad, Ad-PEG and Ad-PEG- HER, respectively	24
Figure 12. In vivo anti-tumor efficacy of Ad-PEG-HER through tail-vein injection.....	25
Figure 13. Comparison of liver and kidney toxicities among mice treated with Ad, Ad-PEG and Ad-PEG-HER, respectively	25

<국문 요약>

전신투여 가능한, HER-2 표적지향성, 아데노바이러스의 개발

HER2/neu는 세포막에 존재하는 성장인자 수용체 (Epidermal Growth Factor Receptor) 중 하나로서 전체 유방암 환자의 20-30%에서 과발현되어 있으며 불량한 예후인자로 알려져 있다. 이러한 HER2/neu를 표적으로 한 신약들이 개발되고 있으며 그 중 대표적인 약제가 Herceptin (Trastuzumab)이다.

아데노바이러스를 이용한 유전자 치료를 항암제로서 사용하는데 가장 큰 문제점은 생체 내 면역반응으로 인하여 전신투여가 어렵다는 점이다. 이러한 문제를 극복하고자 최근 PEG (polyethylene glycol)를 아데노바이러스에 붙이면 (PEGylation) 생체 내 면역 반응을 낮출 수 있고 이는 아데노바이러스의 혈중제거율을 떨어뜨리고 약동학적으로 AUC (area under the curve)를 높여서 전신투여가 가능할 하나의 방법으로 제시되고 있다. 하지만 이러한 PEGylation은 아데노바이러스 주위의 PEG에 의해 아데노바이러스의 세포내로의 접근성이 떨어지는 점이 치료제로 사용하는데 있어서 극복해야 할 문제점으로 제기되고 있다.

본 연구에서는 그 동안 본 연구실에서 암세포 특이적 발현과 함께 암세포 살상능이 극대화 될 수 있도록 개발한, 복제가능 아데노바이러스인 Ad-mTERT- Δ 19-Relaxin을 PEGylation 시킨 후 다시 Herceptin 을 붙여서 삼차원 구조 물질 (ternary structure)을 개발하고 이를 HER2 과발현된 유방암세포주를 대상으로 본 치료제의 in vitro 및 in vivo 효과를 확인하고자 하였다.

아데노바이러스의 PEGylation을 위해 아데노바이러스와 PEG를 연결해주는 cross linker인 Dithiobis (succinimidyl-propionate) (DSP)나 Dithiobis (sulfosuccinimidyl-propionate) (DTSSP)를 유기

용매인 Dimethyl sulfoxide (DMSO)나 수용액 용매를 사용하여 PEG와 반응을 시켜서 PEGylated adenovirus (Ad-PEG)를 제작하였다. 그 후 PEGylated adenovirus를 cross linker인 1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide (EDC)/*N*-hydroxy succinimide (NHS)를 이용하여 동결 건조된 단클론항체인 Herceptin과 반응시켜 삼차원 구조물 (Ad-PEG-HER)을 제작하였다.

이렇게 제작된 물질의 정성분석을 위해 FPLC를 통해 분리된 아데노바이러스 (Ad), PEGylated 아데노바이러스(Ad-PEG), 그리고 Ad-PEG에 Herceptin이 부착된 Ad-PEG-HER 각각의 크기를 DLS (Zeta-potential Analyzer, Photal, Otsuka, Japan)를 이용하여 측정한 결과 세 물질 모두 크기가 약 100nm 정도였으나 Ad → Ad-PEG → Ad-PEG-HER의 구조로 갈수록 크기가 증가함을 확인하였다. 또한 이들 물질들을 이용하여 세포주들에서의 GFP 발현 정도를 확인한 결과 Ad-PEG는 Ad보다 GFP 발현 정도가 감소되었으나 Ad-PEG-HER는 HER2 과발현 세포주인 NIH 3T6.7, MDA-MB-435, 및 MDA-MB-231 세포주에서는 GFP 발현이 Ad-PEG보다 증가됨을 확인할 수 있었다. 또한 이들 3가지 물질을 이용한 세포독성 실험 (MTT assay)에서도 PEG에 의해 감소된 세포독성이 Herceptin이 추가된 Ad-PEG-HER에서 증가됨이 관찰되었다. 이러한 효과가 HER2/neu신호전달 기전을 매개하여 발생하는지 확인하기 위해 competition assay를 진행하였으며 Herceptin을 미리 처리한 경우는 그렇지 않는 경우에 비해 Ad-PEG-HER의 HER2/neu 과발현 세포주에서의 GFP 발현이 감소되는 것을 확인하여 Ad-PEG-HER가 HER2를 통해 감염이 됨을 간접적으로 알 수 있었다.

Ad-PEG-HER는 BALB/c 마우스에서 Ad에 비해 중화항체의 생성이 감소되었는데 이는 PEGylation으로 Ad에 대한 면역학적 반응을 줄여줄 수 있음을 시사하고 있다. 누드마우스 xenograft 모델에서 Ad-PEG-HER는 Ad나 Ad-PEG에 비해 개선된 항종양 효과를 보였지만 통계학적인 유의성은 없었다.

결론적으로, Ad-PEG-HER는 HER2 과발현 유방암 환자에서 치료제로서 가능성 있는 약제라고 판단되며 향후 추가적인 전임상 및 임상연구가 필요할 것이다.

핵심되는 말: 아데노바이러스, HER2, PEG, Herceptin,
암유전자 치료

전신투여 가능한, HER-2 표적지향성, 아데노바이러스의 개발

<지도교수 김 주 향>

연세대학교 대학원 의학과

손 주 혁

I. 서론

유방암은 현재 여성에서 발병률 1위의 암으로 우리나라에서도 그 수가 급격히 증가하고 있다. 하지만, 치료법의 발전에도 불구하고 전체 환자의 약 10% 내에서 처음부터 전이성 유방암으로 발견되고 있으며 비록 조기 유방암으로 내원하여 완치를 목적으로 한 근치적 치료를 한 경우 약 절반의 환자들이 10년 내에 재발을 한다. 이러한, 전이성 혹은 재발성 유방암 환자들은 일반적으로 전신적 치료인 항암약물치료를 받게 된다. 최근에는 이러한 독성이 강한 항암제외에 생물학적 치료제로, epidermal growth factor receptor의 한 종류인 HER-2에 대한 단클론항체 (monoclonal antibody)인 trastuzumab (상품명, Herceptin), 혈관생성인자인 vascular endothelial growth factor (VEGF)에 대한 단클론항체인 bevacizumab (상품명, Avastin) 등이 개발되어 현재 치료에 이용되고 있다¹⁻³. 특히, Trastuzumab은 HER2 과발현하는 전이성 유방암 환자에서뿐만 아니라 수술 후 재발을 줄이기 위한 보조항암치료제로서도 이미 임상에서 사용되고 있다^{4,5}.

표준치료에 실패한 진행성 암환자를 위해서는 새로운 치료 방법의 개발이 필요한데 이 중 중요한 접근 방법 하나가 유전자 치료이

다. 유전자 치료는 레트로 바이러스 (retrovirus), 아데노바이러스 (adenoovirus), AAV (adenovirus associated virus)등을 이용하는 방법들이 주종을 이루고 있으며, 과거에는 복제 불가능 바이러스를 이용한 유전자의 전달이 주된 연구 주제였으나 최근에는 유전자 전달 뿐 만 아니라 바이러스 자체가 복제하여 암세포를 죽게 하여 항암 효과를 극대화 할 수 있도록 제작된 복제 가능한 바이러스에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 아데노바이러스는 우수한 유전자 유전자 전달 효율을 보이며 높은 역가로 생산이 가능하고 쉽게 농축할 수 있을뿐더러 in vivo에서도 유전자 전달이 용이해서 최근 암을 대상으로 하는 유전자 치료에 많이 이용되고 있다⁶⁻⁹. 연세 암연구소에서는 아데노바이러스의 초기 유전자인 E1B 19kD을 제거하여 암세포 살상능을 증대시키고¹⁰, 동시에 바이러스가 암세포 선택적으로 증식할 수 있도록 하기 위해 telomerase reverse transcriptase (TERT) 프로모터에 의해서 바이러스의 복제가 조절될 수 있도록 제작된 Ad-mTERT-△19의 우수한 항종양 효과를 보고한 바 있다¹¹.

아데노바이러스의 감염초기에 발현되는 단백질들은 크게 E1A와 E1B가 있는데, E1A는 감염직후 가장 먼저 발현되는 단백질로 바이러스 복제에 필수적이고, 세포주기를 조절하는 pRb와 결합하여 E2F-pRb 복합체로부터 E2F의 해리를 유도한다¹²⁻¹⁵. E1B 단백질들은 E1B19 kDa와 E1B55 kDa로 구성되어 있다¹⁶. E1B 19kD 유전자는 강력한 세포고사 억제제인 Bcl-2와 구조적으로 기능적으로 유사하여, 아데노바이러스의 초기 발현 유전자인 E1A에 의해 유도되는 세포고사를 억제한다고 알려져 있다¹⁷. 본 연구실에서도 E1B 19kD 유전자가 소실된 아데노바이러스를 xenograft 모델의 종양에 투여하여 세포고사의 활발한 유도과 더불어 암세포 살상능이 크게 증가하였음을 보고하였다¹⁰. 또한, p53의 발현에 의한 세포살상은 주로 세포고사에 의해 이루어지며 이들에 의한 항암효과는 암세포의 세포고사 기능이 정상적일 때 더욱 효과적이다. 따라서 E1B 19kD 유전자가 결손 되어 세포고사를 억제하지 않는 아데노바이러스를 유

전자전달체로 이용한다면, 아데노바이러스의 증식에 따른 암세포의 괴사뿐만 아니라 아데노바이러스 또는 p53의 발현에 의해 유도되는 세포고사를 함께 유도할 수 있어 항종양 효과를 크게 개선시킬 수 있을 것이다. 또한, TERT 프로모터는 암 진행 전단계인 전암 조직과 암세포주 및 암조직에서 활성이 선택적으로 증가한다고 알려져 있는 대표적 암세포 선택적 활성 프로모터로서¹⁸⁻²², 아데노바이러스의 증식이 TERT 프로모터에 의해서 조절되는 Ad-mTERT- Δ 19는 암세포에서 선택적으로 증식하여 세포살상을 유도할 수 있는 장점이 있다.

아데노바이러스를 이용한 항암치료의 또 하나의 장애요소는 바이러스의 전파이다. 종양내에서 결체조직과 세포외기질은 바이러스가 세포에서 다른 세포로 이동하여 감염시키는데 중요한 장애 요인으로 알려져 있다^{23, 24}. 이러한 한계를 극복하기 위해 본연구실에서는 Relaxin을 이용하였다. Relaxin은 구조적으로 insulin 또는 insulin-like growth factors와 유사한데 기능적으로는 interstitial collagen 생성 및 분비를 줄이고 matrix metalloproteinase와 procollagenase의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다²⁵. 본 연구소에서는 이 Relaxin을 탑재한 종양선택적 복제 아데노바이러스는 바이러스의 전파 및 세포고사 유도를 증가시킴을 보고 한바 있다²⁶. 이러한 배경하에 본 연구에서는 Relaxin을 발현하는 Ad-mTERT- Δ 19를 제작하여 다음 단계의 연구에 이용하고자 한다.

현재 임상시험 중인 유전자 치료제들은 대부분 종양에 직접 주사하는 국소치료제이다. 하지만, 국소 치료에는 수술이나 방사선 치료 등 치료 효과가 뛰어난 방법들이 존재하여 유전자 치료제의 대상 환자는 제한적일 수밖에 없다. 따라서, 다른 항암제들이 그렇듯 유전자 치료제도 혈관으로 투입하여 전이암에 대해 효과가 증명되어야 궁극적으로 새로운 신약으로서 각광받을 수 있을 것이다. 하지만, 현재까지 제작된 항암효과가 뛰어난 바이러스들을 전이암 치료를 위해 혈관으로 전신 투여하면 주로는 항체에 의한 면역반응으로 인해 안정성을 잃어 치료효과를 기대하기 어렵다. 따라서, 혈액내에서

의 불안정성을 극복한 재조합 바이러스의 개발은 유전자 치료의 임상 적용을 위해 반드시 해결되어야 할 요소이다.

Polyethylene glycol (PEG)은 전류를 띠지 않고(uncharged) 면역 반응을 유발하지 않는, 수소성 (hydrophilic), 다중물질 (polymer)로서 아데노바이러스 외피단백질의 free lysine residues와 반응하여 공유결합을 함으로써 아데노바이러스 단백질로 인한 인체 내 면역 반응을 감소시킬 수 있는 물질이다²⁷. 그 동안의 연구에서는 PEG의 이러한 성질을 이용하여 바이러스의 전신 투여에 따른 면역원성을 극복하고자 하였다²⁸⁻³². 하지만, 아데노바이러스의 PEGylation은 역작용으로 바이러스가 암세포 특이적으로 접근하는데 어려움을 주고 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위해서 또 다른 epitope을 移用하여 re-targeting이 시도되고 있는데 여기에는 folate, integrin-specific RGD 펩타이드, 혹은 E-selectin-specific antibody 등이 이용되어 왔다³³⁻³⁵.

본 연구에서는 Ad-mTERT- Δ 19 아데노 바이러스를 PEG로 싸서 (PEGylation) 면역반응을 최소화 하여 혈액 내에서의 안정성을 유지하고, 유방암 특이적인 HER-2를 표적화 하는 Ad-mTERT- Δ 19-PEG-Trastuzumab의 3중 (Ternary)바이러스를 개발하여 in vitro, in vivo에서의 항종양 효과를 검증하여 향후 유방암에서 개선된 유전자 치료제로서의 가능성 여부를 규명하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 세포주 및 세포배양

실험에 사용된 세포주들은 유방암 세포주(NIH 3T 6.7, MDA-MB-435, MDA-MB-231), 섬유아 세포주 NIH 3T3, 뇌암 세포주 U251N 그리고 293 세포주 등이며, MDA-MB-435는 서울대학교에서 그 외 모든 세포주들은 ATCC(American Type Culture Collection,

Manassas, VA, U.S.A)에서 구입하였다. 모든 세포주들은 10%의 우태아혈청(GIBCOBRL, Life Technologies, Rockville, MD, U.S.A)과 항생제 penicillin/streptomycin (GIBCOBRL)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCOBRL)으로 5% CO₂의 존재 하에 37℃ 항온 배양기에서 배양하였다.

2. Ad-△E1/GFP 와 Relaxin 발현 Ad-mTERT-△19의 제작

Ad-mTERT-△19¹¹ 바이러스의 E3 부위에 Relaxin을 발현시키기 위해 우선 벡터 pDNA-LIB-RLX (ATCC)로부터 endonuclease *SaI*와 *HindIII*을 이용하여 Relaxin을 잘라내어 벡터 pCA14 (Microbix, Ontario, Canada)에 붙여 pCA14-RLX을 만들었으며 이로부터 CMV-relaxin-polA expression cassette를 제거한 후 이를 미리 endonuclease *BamHI*에 의해 잘린 아데노바이러스 E3 서플 벡터인 pSP72-E3에 붙였다. 이렇게 생성된 pSP72-E3/CMV-RLX은 PvuI를 처리하여 linear form으로 만들었다. Ad-mTERT-△19 역시 endonuclease *SpeI*으로 처리하여 linear form으로 만든 후 이 두 가지 linear 서플 벡터와 아데노바이러스를 E.coli BJ5183에서 동시 형질 전환시켜 유전자 상동 재조합 (homologous recombination)을 유도하였다²⁶.

Ad-△E1/GFP의 제작을 위해 GFP reporter gene을 포함한 pEGFP-N1 (Clonetech, CA)로부터 GFP 유전자를 *Xho I* 과 *Not I* 을 이용하여 분리하였다. 분리된 GFP 유전자를 *Xho I*과 *EcoR V*를 이용하여 pCA14 벡터로 cloning 시켜 pCA14-GFP를 제작하였으며 이 서플 벡터는 *XmnI* 효소를 처리하여 linear form으로 만든 후 복제 불능 아데노바이러스 벡터인 vmd1324Bst (SB Verca, University of Fribourg, Switzerland)와 함께 E.coli BJ5183에서 동시 형질 전환시킨 후 BstB I을 이용해 절단하여 유전자 상동 재조합 (homologous recombination)을 유도하여 pdl-CMV-GFP를 제작하였다. 이렇게 제작된 아데노바이러스들은 293 세포주에서 배양되었으며 CsCl gradient 로 농축 및 순수 분리하였다. 이렇게 분리된 바이러스들은

10 nM phosphate-buffered saline (PBS)-4% sucrose에 혼합하여 -80°C에 보관하였다. 바이러스 역가는 260 nm 에서의 optical density(OD_{260})를 측정하여 구했으며 이때 1 absorbency unit은 10^{12} viral particles per milliliter에 해당되었다.

3. 아데노바이러스, PEG 그리고 Herceptin 과의 3차 구조물 제작 및 제작된 Ad-PEG-HER의 정성 및 정량 분석

생산된 아데노바이러스들과 PEG, Herceptin의 3차 구조물 (ternary structure)의 제작은 Fig. 1에 도식화 하였으며 구조물의 제작 후 정성 및 정량 분석을 진행하였다³⁶. GFP 유전자 3.14×10^{12} vp/mL을 포함한 Ad- Δ E1/GFP와 Relaxin 발현 Ad-mTERT- Δ 19를 phosphate-buffered saline (PBS)-4% sucrose에 보관하였다. 아데노바이러스 0.15M NaCl을 포함한 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.4)에서 Dithiobis (sulfosuccinimidyl-propionate) (DTSSP)와 1:106 mole 비로 (ADV:DTSSP)로 상온에서 미리 반응시켰다. 그 후 Hetero-bifunctional polyethylene glycol derivative (NH₂-PEG-COOH, MW 3400)가 1:105 mole 비(ADV:PEG)로 추가되었다. 2시간 동안 상온에서 반응 후 excess free l-lysine을 추가하면서 반응을 마쳤다. 그 후 이렇게 생산된 물질 중 free PEG residues를 제거하기 위해서 Centricon 50-membrane tubes (Amicon, MW cutoff: 50,000)으로 ultrafiltration을 진행하였다. DSP linker를 이용한 실험에서는 DMSO가 이용되었고 나머지 공정은 DTSSP와 같았다. 이렇게 준비된 Ad-PEG는 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide (EDC)와 N-hydroxysuccinimide (NHS)로 1:10:10 (PEG:EDC:NHS)의 mole 비로 0.15M NaCl을 포함하는 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.4)에서 반응시켰다. 상온에서 30분간 반응시킨 후 EDC 와 NHS residues를 제거하기 위해 Centricon 50-membrane tubes (Amicon, MW cutoff: 50,000)에서 ultrafiltration시켰다. 이렇게 제작된 생성물에 Herceptin® (HER,

185kDa)이 10:1 (PEG:HER) mole비로 추가되었고 이 반응은 4°C에서 2시간 동안 진행되었다. 그 후 반응을 종료시키기 위해 excess free l-lysine이 추가되었다. 마지막으로, 순수한 Ad-PEG-HER를 분리하기 위해 크기에 따라서 정제 가능한 크로마토그래피 Sephacryl S-500 (Amersham Biosciences, Sweden)을 이용하여 실험을 진행하였고 이렇게 정제 분리된 Ad-PEG-HER는 -20°C에서 사용할 때까지 보관하였다. Ad-PEG-HER의 정량적 분석은 protein assay (Bradford method, Bio-RAD)을 이용하여 진행하였다. Linker로 사용된 DTSSP는 수용액 상에서 반응을 일으키지만 본 연구에서는 유기용매에서 반응을 일으키는 DSP를 함께 사용하여 일부 실험을 진행하였고 두 linker (DTSSP, DSP)간의 PEGylation 후 세포내의 유전자 도입 효율을 GFP 발현 정도 및 FACS를 이용하여 비교하였다. 또한, 유기용매인 DMSO의 아데노바이러스의 활성 정도에 대한 영향을 GFP의 세포내 발현 정도를 이용하여 분석하였다.

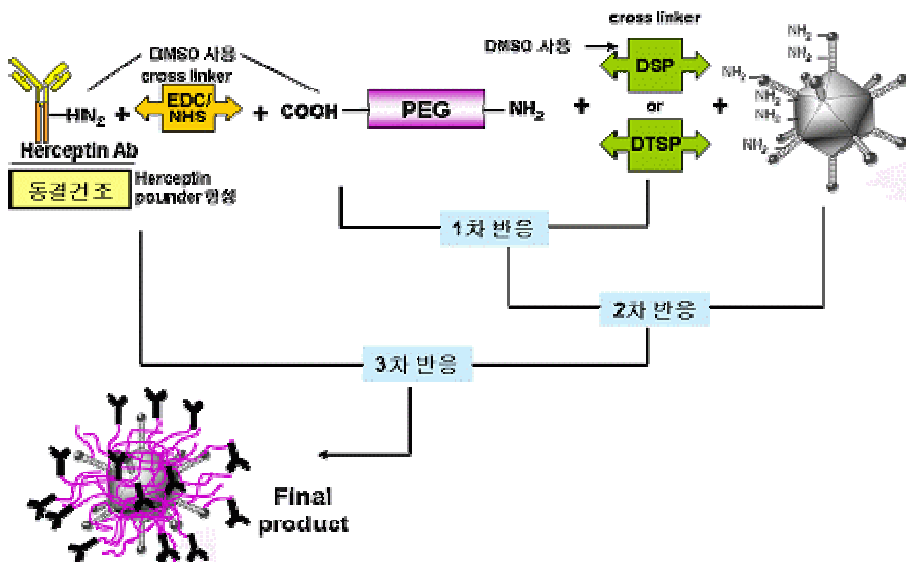


Fig. 1 Generation of Ad-PEG-HER conjugation; Adenovirus was coated with PEG via cross linkers such as DSP or DTSSP and then, Ad-PEG was conjugated with Herceptin monoclonal antibody using cross linker of EDC/NHS.

4. Gold를 이용한 Ad-PEG-HER 의 정성분석을 위한

Au-Ad-PEG-HER의 제작

Ad-PEG-HER을 최종적으로 확인하기 위하여 colloidal gold particles 을 Ad-PEG-HER 에 붙였다. Colloidal gold particles (~20nm)은 참고문헌에 보고 된 바대로 제작하였다³⁷. 준비된 gold particles은 anti-Herceptin Ab (FITC-goat anti-human IgG; 81-7111; ZyMax™, South San Francisco, CA) 에 붙이고 이 복합체를 HER-PEG-ADV 에 다시 붙였다³⁸. 이를 간략하게 요약하면, 준비된 gold particles은 0.1M K₂CO₃을 이용하여 pH 9.0 이 되도록 하였다. 희석된 anti-Herceptin antibody는 상온에서 1시간 동안 colloidal gold particle solution과 반응 시켰다. 그 후 5% (w/w) BSA solution을 추가하여 colloidal gold particles을 안정화하였고 이를 다시 30분 간 incubation하였다. 반응하지 않는 anti-Herceptin Ab을 제거하기 위해 원심분리를 반복하였고 침전물은 0.15M NaCl, 1% BSA 그리고 0.5% NaN₃을 포함한 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 부유하여 보관하였다. Au가 붙은 anti-Herceptin antibody는 Ad-PEG-HER과 함께 4℃에서 12시간 이상 반응시켰다.

5. 세포내 GFP 발현 측정

HER2/neu 양성 유방암 세포주 (MDA-MB-435; 2×10^5 cells/well, NIH 3T 6.7; 1×10^5 cells/well, MDA-MB-231; 5×10^4 cells/well) 그리고 HER2/neu 음성 세포주 (NIH 3T3; 1×10^5 cells/well)를 24 well plate 에 분주 24시간 후 각각의 세포를 Ad, Ad-PEG, 그리고 Ad-PEG-HER로 감염시켰다. 3일 후 MetaMorph Imaging System (Molecular Devices, USA)이 장착된 fluorescence microscopy (Olympus BX51; Olympus Optical, Tokyo, Japan)를 이용하여 관찰하였다. 그 후 유세포 분석을 시행하여 GFP를 정량화 하였다.

6. Herceptin retargeting의 확인을 위한 competition assay

제작한 Ad-PEG-HER 바이러스의 세포내로의 감염경로를 확인하기 위하여 Herceptin 또는 PBS를 각각 투여한 후의 바이러스의 감염 정도를 비교하였다. 이를 위하여, MDA-MB-435 세포를 1×10^5 cells/well로 24 well에 분주 한 다음날 well 당 바이러스 감염 전에 Herceptin을 200ug/well 그리고 PBS 동일 양을 4°C에서 1시간 동안 각각 처리하였다. 그 후 세포주를 PBS로 washing 한 후 Ad, Ad-PEG, 그리고 Ad-PEG-HER를 상온에서 2시간 동안 감염시키고 다시 PBS로 washing하였다. 그 후 5% 우태하혈청이 포함된 DMEM 1ml을 넣어준 48시간 후 GFP 발현을 측정하였다.

7. MTT assay를 통한 종양 세포 살상능 비교

종양 살상 아데노 바이러스인 Ad-mTERT- Δ 19-Relaxin과 이 바이러스에 PEG 그리고 PEG-Herceptin을 결합한 각 바이러스의 암세포 살상능을 비교하기 위하여, 유방암 세포주 NIH 3T 6.7, MDA-MB-435, MDA-MB-231, 뇌암 세포주 U251N 등을 24-well plate에 분주하고 24시간 후 Ad-mTERT- Δ 19-Relaxin 아데노바이러스, Ad-mTERT- Δ 19-Relaxin-PEG, Ad-mTERT- Δ 19-Relaxin-PEG-HER를 감염시켰다. 감염 4일 후, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 2mg/ml) 용액 200 μ l씩을 plate well에 첨가하여 4시간동안 37°C 항온기에서 반응시킨 후 MTT에 의해 살아있는 세포에서 포마젠 결정이 형성되면 1 ml의 DMSO(dimethyl sulphoxide)를 첨가하고 37°C에서 10분간 방치한 후 microplate reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 상대적 생존율을 측정하였다. 세포의 생존률은 측정된 흡광도 값을 이용하여 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

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

8. 아데노바이러스의 혈중 clearance의 측정

BALB/c 마우스에서 각 아데노바이러스의 혈중 clearance 분석을 위해서는 실시간 정량 분석 PCR을 시행하였다. BALB/c 마우스의 꼬리 정맥에 각각의 아데노바이러스를 1×10^{10} vp로 주사 후 안와정맥에서 100 ul의 전혈을 0, 5, 10, 20, 30, 40 그리고 60분에 각각 채취하였다. 채취한 혈액을 QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 아데노바이러스 DNA를 포함한 전체 DNA를 추출한 후 PCR 수행을 위해 Nanodrop UV spectrophotometer를 이용하여 정량 한 후 5 ng의 DNA를 template로 이용하여 quantitative real-time PCR로 각각의 시간대별로 채취한 혈액 시료에서 viral genome을 측정하였다.

9. 중화 항체 및 IL-6 측정

아데노 바이러스에 대한 BALB/c 마우스에서 면역반응을 측정하기 위해 혈중 중화항체 및 IL-6를 측정하였다. 중화항체를 확인하기 위해 1×10^{10} vp의 Ad, Ad-PEG 그리고 Ad-PEG-HER 아데노 바이러스를 각각 BALB/c 마우스의 꼬리 정맥에 주사 후 8일 후에 안와 정맥에서 약 1ml의 전혈을 각각 채취하였다. 각 마우스로부터 채취 한 혈액으로부터 serum을 분리한 후 중화항체 측정을 위해서 56 °C에서 30분간 heat inactivation시킨 후 다음 실험 수행 전까지 -20 °C에 보관하였다. 그 뒤 24 well 각각에 U343 세포 (4×10^4)를 1ml media 와 함께 분주한 후 다음날 Ad- Δ E1/GFP 바이러스 400 MOI를 전체 300ul 안에 각각의 Ad로부터 얻어진 anti-Ad serum 1:5, 1:10, 1:30의 비율이 되도록 섞고 이 혼합물을 37 °C에서 20분

간 반응시켰다. 그 뒤 세포가 분주되어 있는 well의 media를 제거한 뒤 Ad- Δ E1/GFP와 anti-Ad serum이 섞인 혼합물 300 μ l를 세포에 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 처리하였다. 반응 종료 후 혼합물을 제거한 뒤 5% FBS가 섞인 media 500 μ l로 washing 한 뒤 5% FBS media 1 ml을 넣어서 48시간 배양 후 GFP 발현 정도를 형광 사진 및 FACS 분석을 통하여 간접적으로 확인하였다.

IL-6는 1×10^{10} vp의 Ad, Ad-PEG 그리고 Ad-PEG-HER 각각의 아테노바이러스를 BALB/c 마우스의 꼬리 정맥에 주사 한 3, 6, 12, 24, 48시간 후 안와정맥에서 뽑은 300 μ l의 전혈에서 serum을 분리한 후 IL-6 ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 진행하여 측정하였다.

10. 생체내 항종양 효과 검증

생후 6 ~ 8 주 경과된 누드마우스의 복벽에 MDA-MB-435 유방암 세포주 1×10^7 개를 피하 주사한 뒤, 종양의 크기가 약 100 - 150 mm^3 정도에 도달하였을 때 1×10^{10} vp의 Ad, Ad-PEG, Ad-PEG-HER와 음성 대조군인 PBS를 각각 꼬리정맥에 이틀간 3회 투여한 후 종양의 성장을 관찰하였다. 종양의 크기는 caliper를 이용하여 종양의 장축과 단축을 측정한 후 다음과 같은 공식으로 산출하였다. $Tumor\ size(\text{mm}^3) = (\text{단축 } \text{mm})^2 \times \text{장축 } \text{mm} \times 0.523$ 종양의 용적비교는 Mann-Whitney test를 이용하였다.

11. 독성연구

제작한 아테노바이러스의 독성을 보기 위해서 BALB/c 마우스의 꼬리 정맥에 PBS, Ad, Ad-PEG, Ad-PEG-HER 각각을 1×10^{10} vp로 주사하였다. 주사 3일 후 안와정맥에서 전혈을 채취하여 원심분리 후 serum을 분리 한 뒤 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT), T-bilirubin 그리고 creatinine 수

치를 측정하여 비교하였다.

III. 결과

1. PEGylation시의 cross linker 들의 효능 비교와 유기용매인 DMSO의 적정 농도의 결정

Cross linker로 DSP 사용시 필요한 DMSO의 농도를 결정하기 위해 DMSO의 농도에 따른 Ad- Δ E1/GFP의 GFP 발현정도를 평가하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 30% 이상의 DMSO 농도에서는 아데노 바이러스의 활성도가 떨어지는 것을 확인할 수 있었고 30% DMSO 농도에서 최적의 아데노바이러스 활성도를 보였으나 Ad-PEG-HER 제작 과정 중에서의 Herceptin이나 adenovirus의 단백질 성분에서의 안정성에의 영향을 고려하여 이후의 공정에서는 10%의 DMSO를 사용하였다.

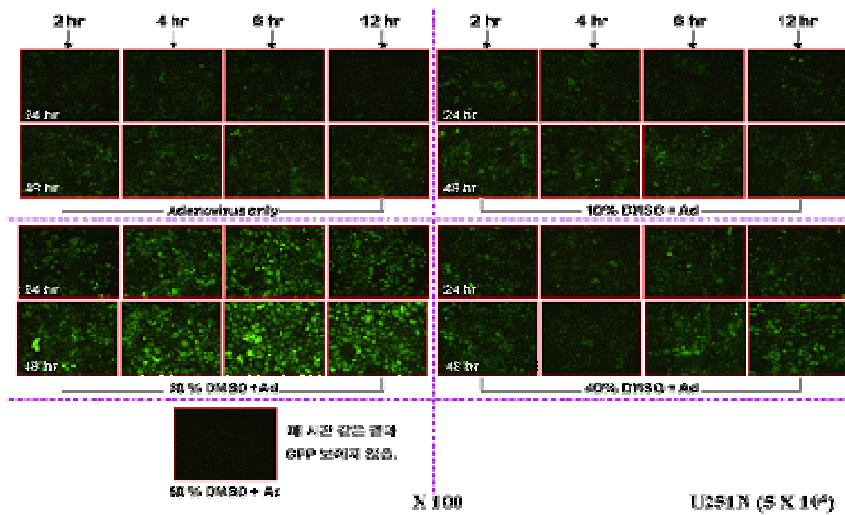


Fig. 2 Effects of DMSO on adenovirus infection; increased concentration of DMSO shows clearly enhanced transduction efficacy until 30% of DMSO concentration. However, concerns about the potential hazard of DMSO on protein such as adenovirus or Herceptin made the concentration of DMSO limited to 10%.

2. PEGylation 에 사용되는 cross linker 에 따른 유전자 전달 효율 비교

Cross linker로서 DTSSP 와 DSP는 1:10⁶ molar ratio로 사용하였으며 정량적으로 유전자 전달 효율을 보고자 시행한 FACS 분석 상 유기용매를 사용하는 DSP가 적은 농도에서도 DTSSP에 비해 PEGylation 효율이 좋음을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 하지만, DSP를 이용한 PEGylation시 유기용매인 DMSO를 사용해야 하는 단점으로 인해 향후의 실험은 수용액상에서 반응을 일으킬 수 있는 DTSSP를 사용하여 PEGylation을 진행하였다.

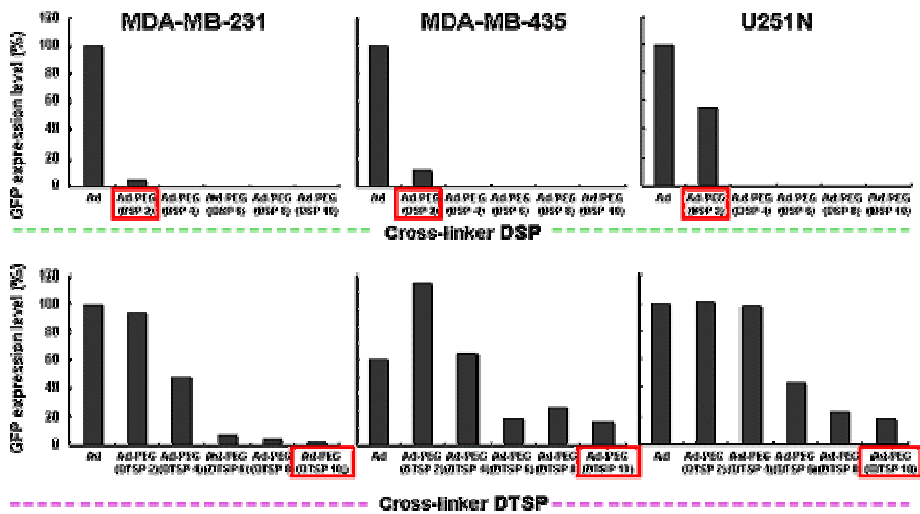


Fig. 3 Transduction efficiencies of PEGylated Ad with different cross-linkers (DSP, DTSSP) along with different concentrations; GFP expression was decreased significantly with the DSP cross linker than with the DTSSP, which means DSP via the solvent of DMSO shows better PEGylation efficacy than DTSSP.

3. Ad-PEG-HER conjugate 의 정성 분석

제작한 Ad-PEG-HER의 정성분석을 위해서 FPLC 후 분리된 Ad, Ad-PEG, Ad-PEG-HER 각각을 DLS를 시행하여 size를 측정한 결과 **Fig. 4.** 같은 size distribution을 보였다. 그 결과 세 물질 모두 직경이 약 100 nm 정도였으나 Ad에 비해서 Ad-PEG가 더 크고, 또 Ad-PEG-HER가 가장 직경이 커서 아데노바이러스에 PEGylation 및 Herceptin이 붙음으로써 크기가 증가된 것으로 확인되었다.

또한 Ternary structure를 시각적으로 확인하기 위해 gold를 이용하여 반응시킨 후 시행한 TEM Image상, Fig. 5에서 보듯이 Ad, Ad-PEG, Ad-PEG-HER 사이에서는 서로간에 차이를 구분하기 어려웠다. 하지만, Herceptin에 대한 antibody에 gold를 붙여서 반응시킨 Au-Ad-PEG-HER의 TEM Image를 통해서 Ad-PEG-HER의 3차 구조가 생성되었음을 확인할 수 있었다.

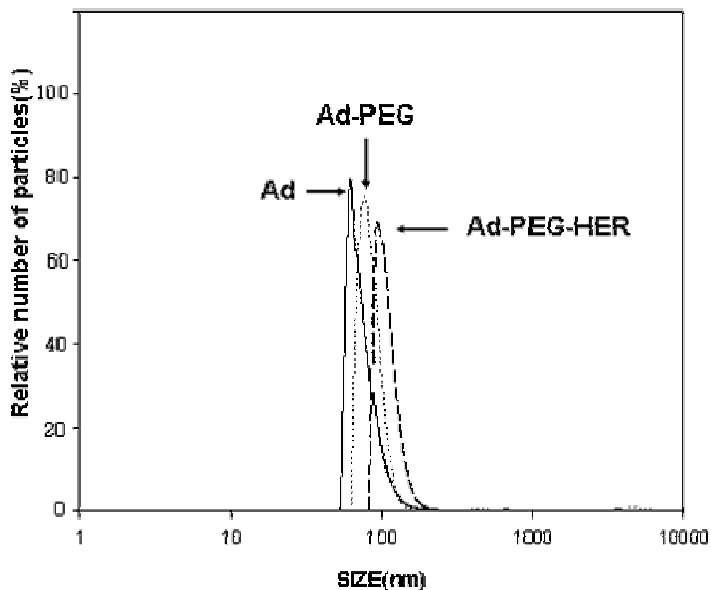


Fig. 4 Determination of average size of the three particles; Even though three particles (Ad, Ad-PEG, Ad-PEG-HER) shows similar sizes on DLS examination around 100 nm, it shows a tendency to be larger in size as Ad is conjugated to PEG and to be largest in Ad-PEG-HER.

TEM Image

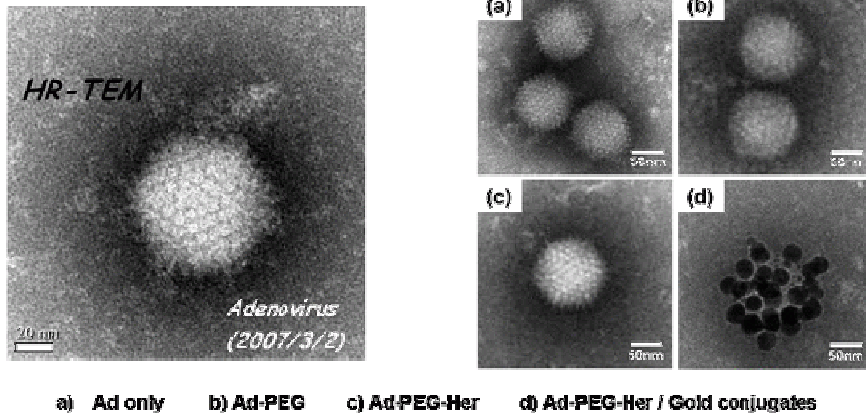


Fig. 5 Transmission Electron Microscopy (TEM) images of (a) Ad, (b) Ad-PEG, (c) Ad-PEG-HER and (d) Ad-PEG-HER-Au

4. Ad, Ad-PEG, Ad-PEG-HER 바이러스의 세포내 형질도입 효율을 비교

HER2/neu가 과발현된 세포주에서 Ad-PEG-HER가 PEGylation에 의해 감소된 아데노바이러스의 세포내 형질도입 효율을 Herceptin에 의한 retargeting을 통해 개선할 수 있는지를 보고자 본 실험을 진행하였다. 그 결과 모든 세포주에서 Ad-PEG는 Ad 보다 감소된 형질 도입율을 보였고 HER2/neu 과발현 세포주인 NIH3T6.7, MDA-MB-435, MDA-MB-231 세포주에서는 Ad-PEG에 비해서 Ad-PEG-HER가 더 나은 형질도입을 보인 반면 HER2/neu가 발현되지 않는 NIH3T3 세포주에서는 Ad-PEG에 비해 큰 차이를 보이지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 6).

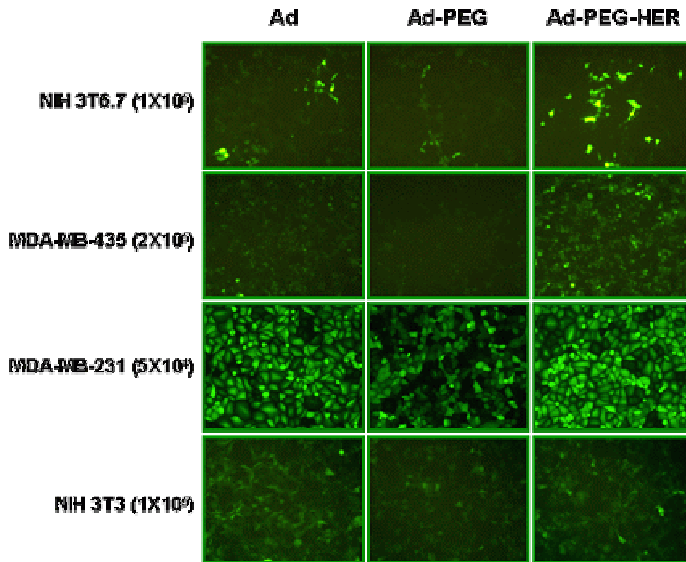


Fig. 6 Fluorescence microscope images of cells followed by the incubation with Ad, Ad-PEG and Ad-PEG-HER in HER2 positive cell lines (NIH 3T6.7, MDA-MB-435, MDA-MB-231) and HER2 negative cell line (NIH 3T3). In HER2 positive cell lines, the addition of Herceptin to Ad-PEG overcomes the decreased GFP expression attributed to the addition of PEG to adenovirus while in HER2 negative cell lines, it does not.

5. 복제가능 아데노바이러스를 이용해 생성된 Ad-PEG-HER의 종양 세포 살상 효과 비교 검증

복제가능 아데노 바이러스인 Ad-mTERT- Δ 19-Relaxin를 이용하여 Ad-PEG-HER를 제작한 후 HER2/neu 과발현 세포주와 발현되지 않는 세포주에서의 각각 바이러스의 세포살상능을 MTT assay를 이용하여 비교하였다. 그 결과 HER2/neu 과발현 세포주에서는 Ad-mTERT- Δ 19-Relaxin에 비해 Ad-mTERT- Δ 19-Relaxin-PEG는 PEGylation에 의해서 감소된 세포살상능을 확인할 수 있었고 Heceptin이 conjugation 된 Ad-PEG-HER에서는 Ad-mTERT- Δ 19-Relaxin에 비해서는 우월하지 못한 세포살상능을 보이지만

Ad-mTERT- Δ 19-Relaxin-PEG 에 비해 상대적으로 증가된 세포 살상능을 보임을 확인하였다, 하지만 HER2/ neu를 발현하지 않는 세포주인 U251N 에서는 차이를 확인할 수 없었다 (Fig. 7)

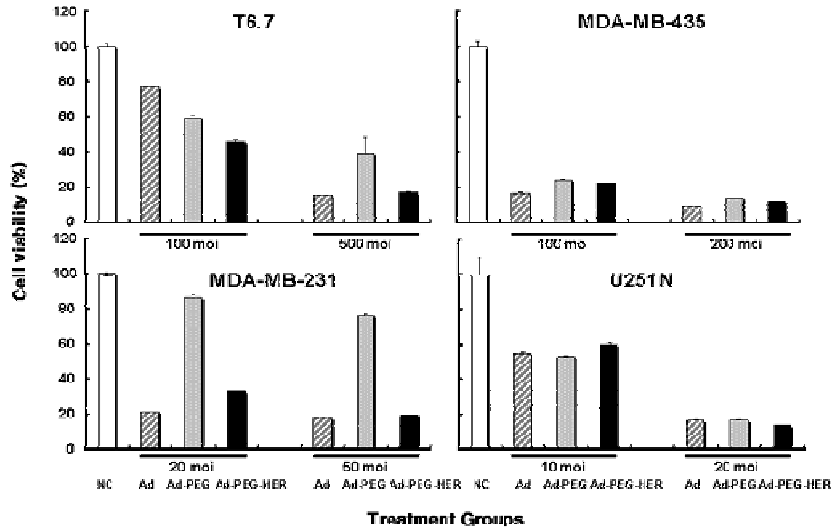


Fig. 7 MTT assay of the Ad, Ad-PEG, and Ad-PEG-HER using Ad as a replication competent adenovirus (Ad-mTERT- Δ 19-Relaxin) in cell lines of HER2 expressing (T6.7, MDA-MB-435, MDA-MB-231) and HER2 negative (U251). In HER2 positive cell lines (T 6.7 and MDA-MB-231), Ad-PEG-HER shows an increased cytotoxicity than Ad-PEG, however, there was no significant difference between them in U251 cell line.

6. Her2/neu 과발현 세포주에서의 Ad-PEG-HER 의 감염경로 검증

Ad-PEG-HER의 감염 경로를 확인하기 위하여 미리 Herceptin 항체를 전처치를 한 MDA-MB-435 세포주에서는 Ad-PEG-HER의 세포감염이 상대적으로 낮았지만 Herceptin 전처치를 하지 않은 MDA-MB-435 세포주에서는 Ad-PEG-HER는 PEGylatin에 의해 감소된 형질 도입을 증가 시킴을 보아서 Ad-PEG-HER는 Her2/neu 를 통해 감염되었을 것으로 추정된다 (Fig. 8).

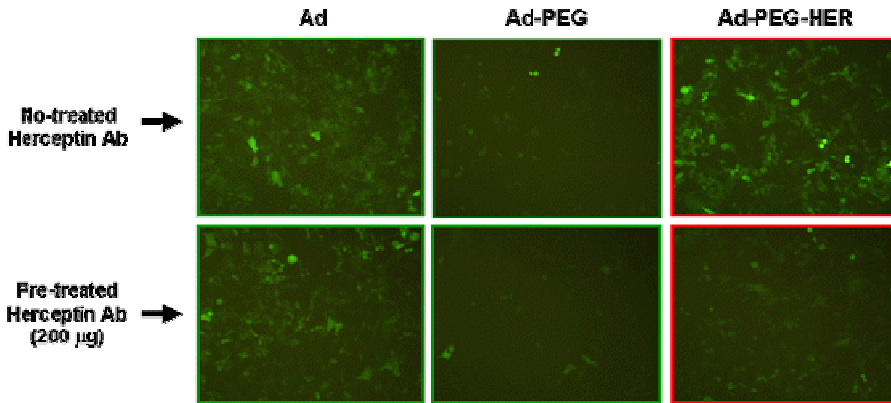


Fig. 8 Comparisons of Ad-PEG-HER transduction efficiency in HER2 positive cell line (MDA-MB-435) with/without pretreated Herceptin (competition assay). Ad-PEG-HER showed decreased GFP expression in MDA-MB-435 cells where Herceptin monoclonal antibody had been treated before, indicating HER2/neu was a target at which Ad-PEG-HER acted.

7. Ad, Ad-PEG, Ad-PEG-HER 의 Pharmacokinetics

Ad, Ad-PEG, 및 Ad-PEG-HER 각각의 아데노바이러스 1×10^{10} vp를 BALB/c 마우스의 꼬리 정맥에 주사 후 안와정맥에서 100 ul의 전혈을 0, 5, 10, 20, 30, 40 그리고 60분에 각각 채취한 후 PCR을 이용하여 측정된 혈중 viral genome은 Fig. 9 와 같았다. Ad는 10분에서 1.8×10^3 vp/mL 검출 되었으나 Ad-PEG-HER는 10분에 1×10^4 vp/mL이 검출되어 Ad-PEG-HER의 경우 Ad에 비하여 약 5 배 정도로 높은 아데노바이러스 혈중 역가를 보였다. 하지만, 주사 후 20분부터는 Ad 그리고 Ad-PEG-HER 아데노바이러스의 역가를 보이지 않았다. 이에 비해서 Ad-PEG는 40분까지 혈중에서 아데노바이러스가 발견되는 소견을 보였다.

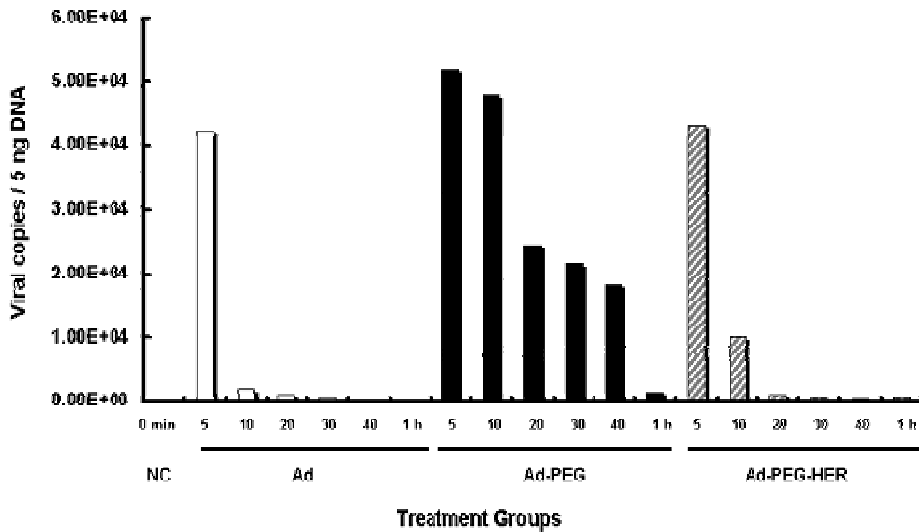


Fig. 9 Pharmacokinetics of Ad, Ad-PEG and Ad-PEG-HER in BALB/c mice shows increased circulation time of Ad-PEG-HER compared to that of Ad.

8. IL-6 및 중화 항체의 측정 결과

생체내에서 각각의 Ad, Ad-PEG, Ad-PEG-HER의 혈중 면역반응 유도 정도를 확인하기 위해 중화항체 및 IL-6를 측정하였다. 각각의 아데노바이러스 주사 3시간 후부터 최대 48시간 후까지 각 시간대 별 IL-6의 발현은 Fig. 10과 같았다. 3시간째의 각 Ad, Ad-PEG, Ad-PEG-HER의 IL-6는 16, 11, 13 pg/ml로 유사한 발현 정도를 보였다. 그러나 바이러스 투여 후 6시간째의 Ad의 IL-6의 혈중농도는 다른 투여 그룹들에 비해서 411pg/mL로 높은 발현이 관찰되었고 시간이 지날수록 감소되는 경향이 관찰되었다. 반면에 Ad-PEG에서는 동 시간대에 14pg/mL이었고 Ad-PEG-HER는 77pg/mL로 Ad에 비해서 상당히 낮은 소견을 보였고 그 이후의 시간에서도 비슷한 경향을 보였다.

아데노바이러스 처리 후 생성된 중화항체의 정도를 확인하기 위해 각 아데노바이러스 (Ad, Ad-PEG, Ad-PEG-HER)에 의해 유도된

anti-serum과 Ad- Δ E1/GFP를 U343 세포주가 포함된 well에 처리하였다. 각각의 아데노바이러스에 대한 중화항체가 포함된 serum을 희석시킴에 따른 Ad- Δ E1/GFP의 GFP발현 정도를 확인한 결과는 Fig. 11과 같았다. 그 결과 Ad에서 얻어진 anti-serum은 Ad- Δ E1/GFP로 인한 GFP 발현을 anti-serum 농도에 비례하여 감소시켰지만 Ad-PEG와 Ad-PEG-HER에서는 이러한 GFP 발현의 감소를 확인할 수 없어서 Ad-PEG와 Ad-PEG-HER에서는 중화항체가 적게 생성되었음을 간접적으로 확인할 수 있었다. 이를 정량적으로 확인하고자 시행한 GFP FACS도 비슷한 결과를 보였다. 가장 적게 희석된 1:5 비율의 anti-serum을 첨가한 경우, Ad에서는 9800 정도 발현하였지만 Ad-PEG에서는 18,000, Ad-PEG-HER에서는 27,000정도가 발현되어 상대적으로 중화항체가 적게 생성되었음을 정량적으로 확인하였다.

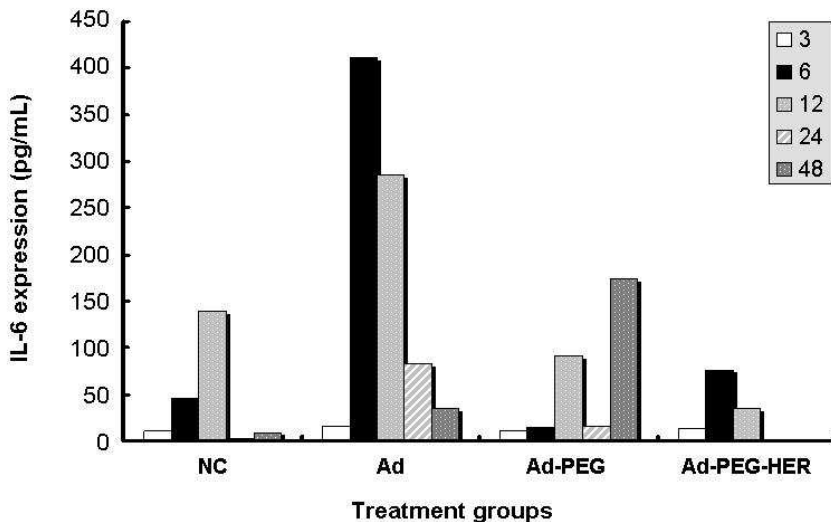


Fig. 10 Comparison of serum IL-6 concentration among Ad, Ad-PEG and Ad-PEG-HER shows decreased IL-6 production in Ad-PEG-HER treated mice than in Ad administered mice at 6, 12, 24 and 48 hours. However, there was little difference in IL-6 production at 3 hours after each agent (Ad, Ad-PEG, Ad-PEG-HER) had been administered.

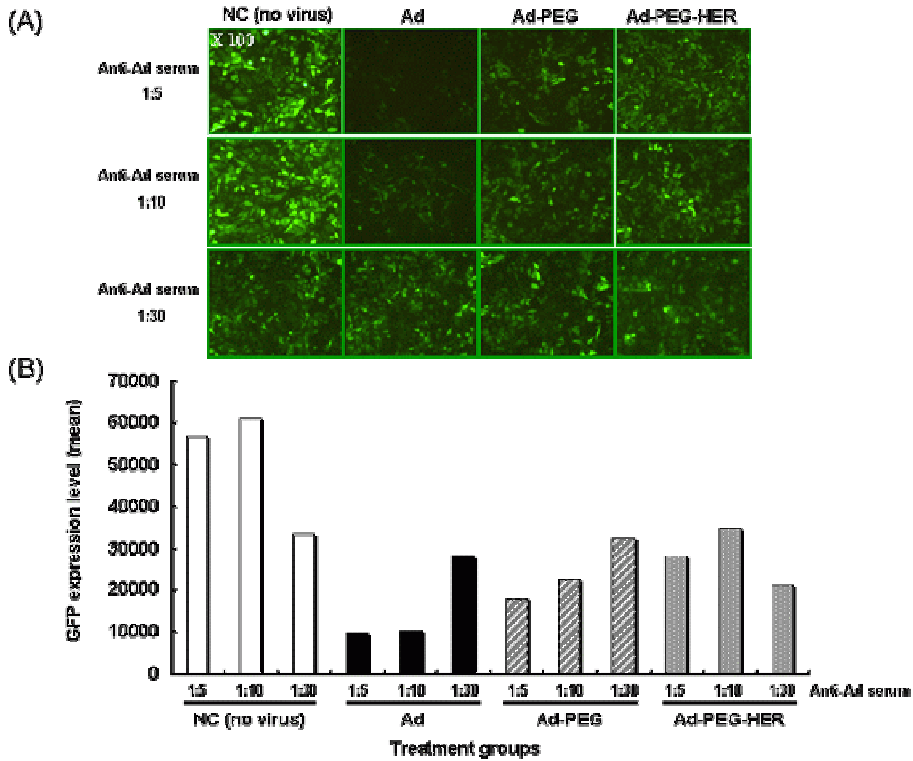


Fig. 11 Ad-PEG and Ad-PEG-HER show increased GFP expression compared to Ad after treating with anti-Ad-PEG, anti-Ad-PEG-HER and anti-Ad-serum, respectively, indicating less production of neutralizing antibody provoked by Ad-PEG and Ad-PEG-HER.

9. 생체내 항 종양 효과

PBS 그리고 Ad, Ad-PEG, Ad-PEG-HER 1×10^{10} vp를 이틀 간격으로 각 군마다 6마리씩의 누드마우스의 꼬리 정맥에 3회 주사하였다. 종양성장을 36일까지 관찰한 바로는 PBS 1655.7 mm^3 , Ad 1616.3 mm^3 , Ad-PEG 1440.5 mm^3 , 그리고 Ad-PEG-HER는 1152.6 mm^3 , 크기를 보였다. Ad-PEG-HER가 In vivo 상 가장 항종양효과가 좋은 경향을 확인할 수 있었다 (Fig. 12). 하지만, 이는 통계학적으로 유의하지 않았다 ($P \text{ value} > 0.05$)

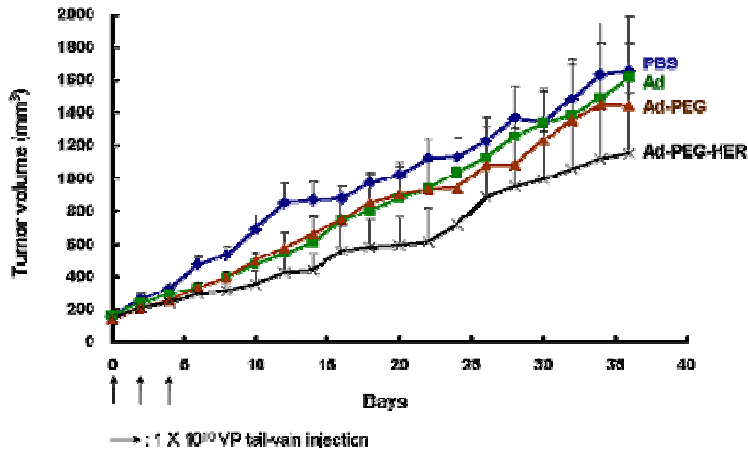


Fig. 12 In vivo anti-tumor efficacy of Ad-PEG-HER through tail-vein injection was compared with PBS, Ad, and Ad-PEG-HER. Even though Ad-PEG-HER shows a better in vivo activity than the other controls, it was not statistically significant.

10. 독성연구

Ad, Ad-PEG, 그리고 Ad-PEG-HER를 BALB/c mice의 꼬리정맥에 투여 후 검사한 AST, ALT, T-bilirubin, creatinine치는 어떤 바이러스도 처리하지 않은 대조군에 비해서 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 13).

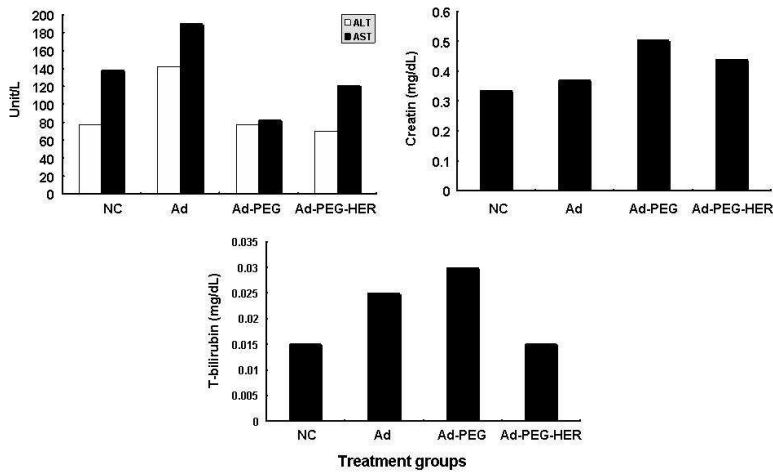


Fig. 13 Compared to Ad and Ad-PEG, Ad-PEG-HER did not increase liver and renal toxicities.

IV. 고찰

암유전자 치료에 아데노바이러스를 주로 많이 이용하는 이유는 다른 바이러스에 비해서 상대적으로 많은 양의 바이러스 생산이 쉽고, 아데노바이러스는 분열하거나 분열하지 않는 세포 모두에 상당히 높은 효율로 유전자를 전달할 수 있으며, insertional mutagenesis 가능성이 없으며 바이러스 biology가 잘 알려져 있기 때문이다. 하지만, 이러한 장점에도 불구하고 아데노바이러스를 이용한 유전자 치료에 있어서 가장 큰 단점은 아데노바이러스의 유전자를 싸고 있는 capsid protein 이 강력한 innate immune response를 유도한다는 것이다. 또한 일반 성인들은 대부분 adenovirus serotype 5에 대한 neutralizing antibody가 있어서 반복투여가 어렵다는 점이다. 또한, 아데노바이러스는 대부분 세포내로의 감염이 세포 표면의 coxsackie and adenovirus receptor(CAR) 그리고 alpha v integrins을 통해서 일어나는데 이러한 수용체는 암세포 외에도 많은 다른 정상세포들에서 발견되고 있어서 특정세포에 특이적으로 유전자 전달이 어렵다는 점이다³⁹⁻⁴². 이러한 단점들을 극복하고자 하는 시도로 O' Riordan 등은 PEGylation의 유용성을 보고한 바 있다³². PEG는 미국 FDA에서 화장품, 식품, 의약품에서 사용이 허가되어 현재 PEG-interleukin-2, PEG-alpha interferon 등의 약제로 실제 임상에서 사용 중이다⁴³⁻⁴⁵.

아데노바이러스의 PEGylation에는 단백질의 lysine residue가 주로 target 이 되는데 이때 cross linker가 필요하고 본 연구에서는 DSP와 DTSSP를 이용하였다. 최종적으로는 DTSSP를 사용하여 Ad-PEG-HER를 제작으며 DSP를 사용하기 위한 DMSO 농도 결정 시 DMSO의 농도에 비례하여 아데노바이러스 유전자 전달의 효율이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 30%의 DMSO에서 아데노바이러스의 유전자 전달 효율이 가장 좋았지만 DMSO의 potential cytotoxicity를 고려하여 10%의 농도를 이용하였다. 그러나 DMSO가 아데노바이러스의 감염을 촉진하는 기전은 현재까지

명확히 규명된 바가 없어서 향후 DMSO와 유전자 전달 효율에 대한 연구가 더 필요할 것이다.

본 연구자들은 ternary structure의 Ad-PEG-HER 제작 및 validation을 시행하여 보고한바 있다²⁶. 이번 연구에서는 다른 세포주들 (NIH 3T6.7, MDA-MB-435, MDA-MB-231, NIH 3T3)를 이용하여 Ad, Ad-PEG과 Ad-PEG-HER의 세포내 유전자 형질 도입 효율 및 MTT Assay를 이용한 세포독성실험을 진행하여 비교한 결과 Ad-PEG보다는 HER2/neu 발현 세포주들에서 유의하게 Ad-PEG-HER가 세포내 유전자 형질 도입을 증가시키고 세포살상 효과도 좋음을 확인할 수 있었다. Ad-PEG-HER의 개선된 세포 살상효과 및 유전자 전달 효율이 HER2/neu를 매개로 하는지 규명하기 위해 Herceptin을 세포에 전처리한 후 Ad-PEG-HER를 투여하는 competition assay를 수행한 결과 Herceptin 투여 후 Ad-PEG-HER의 유전자 형질 도입 효율이 현저히 감소함을 확인하여 세포표면의 HER2/neu를 매개로 하여 Ad-PEG-HER의 감염이 이루어짐을 확인할 수 있었다. 그러나 NIH3T6.7 세포주는 MDA231에 비해 훨씬 많은 HER2/neu를 발현함에도 불구하고 Ad-PEG-HER에 의한 GFP형질도입이 낮은 결과를 보이고 있는데, 이는 NIH 3T6.7이 murine cell line으로 일반적으로 murine cell line은 아데노바이러스 transduction에 가장 중요한 CAR expression이 낮은 것으로 알려져 있어 이러한 점이 상대적으로 낮은 세포내 형질 도입에 영향을 미쳤을 것이라고 판단된다.

아데노바이러스를 혈액내 주입시 반감기는 2분 이내이며 대부분의 투여 바이러스는 즉시 간에 축적되는 것으로 알려져 있다²⁸. 그러나 Ad-PEG의 혈중제거율은 아데노바이러스를 주사하는 경우에 비해 1/4로 감소한다²⁸. 또한 in vivo에서 아데노바이러스를 PEGylation하는 정도가 올라갈 수록 유전자 전달 효율이 증가하는 것으로 보고 되고 있다. 즉 아데노바이러스 capsid protein의 90%가 PEGylation이 되면 유전자 전달효율이 암세포에서 35배 증가하고 간에서 제거되는 비율은 낮아짐이 보고되고 있다³³. 또한 아데노

바이러스에 대한 innate immune response를 보기 위해 측정된 BALB/c 마우스에 아데노바이러스 주사 후 측정된 혈중 IL-6는 Ad-PEG의 경우 PEGylation 하지 않는 Ad에 비해 30% 정도의 적은 IL-6를 생성하는 것으로 알려져 있다³¹. 하지만 이렇게 개발된 Ad-PEG는 표적 세포에의 선택적 감염이 어려운 문제점이 있다. 이를 극복하기 위한 방안으로는 Ad-PEG에 peptides, protein, antibodies 등의 표적 특이적 ligand를 부착하는 방법이 연구되고 있다. 이러한 시도 중에는 RGD, fibroblast growth factor-2등을 이용한 Ad-PEG-ligand에 관한 연구보고가 있다^{30, 34}. Eto 등은 CAR 발현유무와 관계없이 RGD-PEG-Ad는 PEG-Ad에 비해서 200배 가까이 유전자 전달 효율이 높음을 보고하였다³⁴. 본 연구에서는 항체 특히 유방암 치료제로 잘 알려진 monoclonal antibody인 Herceptin을 표적인지 물질로 이용하였다. Herceptin은 $K_d=0.1nM$ 로 HER2/neu에 high affinity를 보이는 단클론 항체로 이미 세포주, xenograft model 그리고 임상에서의 유용성이 잘 알려져 있다⁴⁶. 따라서, 본 연구는 HER2/neu를 표적으로 한 Ad-PEG-HER의 ternary structure를 이용한 최초의 pharmacokinetics 그리고 in vivo 연구이다. 약동학적 결과를 보면 2분이 반감기라고 알려진 Ad에 비해 circulation time 이 증가된 것으로 보인다. 즉, Ad 투여 후 10분이 지나서는 혈중 Ad가 $1.8 * 10^3$ vp/mL 검출 되었으나 Ad-PEG-HER는 10분에 $1 * 10^4$ vp/mL이 검출되어 Ad-PEG-HER는 Ad에 비해서 약 5배 높은 아데노바이러스의 혈중 역가를 보였다. 하지만, Ad-PEG-HER는 Ad-PEG에 비해서는 반감기가 짧아서 이것이 Herceptin에 의한 것인지 향후 분석이 필요할 것이다. 한 가지 가능성은 Herceptin이 humanized monoclonal antibody로 약 5%정도가 murine protein이라서 면역학적 반응을 유발하여 circulation time에 영향을 미쳤을 수 있을 것이다.

또한, in vivo에서 innate immunity를 보고자 각 Ad, Ad-PEG, Ad-PEG-HER 투여 3시간 후의 IL-6는 16, 11, 13 pg/ml로 거의

유사한 발현 정도를 보였다. 그러나 바이러스 투여 후 6시간째의 Ad의 IL-6의 혈중농도는 다른 투여 그룹들에 비해서 411 pg/mL로 높은 발현이 관찰되었고 시간이 지날수록 감소되는 경향이 관찰되었다. 반면에 Ad-PEG 투여군에서는 동 시간대에 IL-6농도가 14 pg/mL이었고 Ad-PEG-HER 투여군은 77 pg/mL로 Ad에 비해서 상당히 낮은 소견을 보였고 그 이후의 시간에서도 비슷한 경향을 보였다. 한 문헌에서는 Ad-PEG 투여군에서 투여 6시간후의 IL-6가 Ad 투여군에 비해 약 30%정도 감소되는 것으로 보고되고 있는데 본 연구에서는 다른 결과를 보였다³¹. 본 연구에서 6시간에서 IL-6의 혈중농도는 각 군간에 차이가 있었으나 이는 3시간 검사에서 안와정맥에서 채혈을 함으로써 생기는 tissue injury에 의해 이차적으로 생겼을 가능성이 높을 것으로 사료된다. 대신 3시간의 IL-6 양을 통해 각 군에서의 아데노바이러스로 인한 면역반응 유발 정도를 알 수 있을 것으로 사료되나 본 연구에서는 각 군에서 IL-6 양은 차이가 없었다.

또한 본 치료제에 의한 humoral immunity는 neutralizing antibody를 in vivo에서 간접적으로 측정하였다. Ad 투여 후 채취한 serum의 투여로 Ad- Δ E1/GFP에 의한 U343 세포주로의 GFP delivery는 serum농도가 높을수록 GFP의 발현이 감소되었으나 Ad-PEG, Ad-PEG-HER 투여 후 채취한 serum은 Ad- Δ E1/GFP에 의한 U343 세포주로의 GFP delivery에 크게 영향을 주지 않아서, 생성된 serum내의 neutralizing antibody가 적었을 것임을 간접적으로 확인할 수 있었다. Mouse xenograft에서의 항종양 효과는 6마리의 누드마우스를 대상으로 확인하였는데 Ad-PEG-HER가 PBS 뿐 아니라 Ad, Ad-PEG에 비해서도 종양의 성장을 더욱 억제함을 확인할 수 있었으나 통계학적으로는 유의하지 않았다. Ad-PEG-HER의 간 및 신장 독성을 보기 위한 in vivo 연구에서도 특이할 만한 독성을 보이지 않아서 HER2양성 유방암에서 치료제로 사용하기 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구를 통하여 제작한 Ad-PEG-HER의 3중 구조 유전자 치료제는 HER2/neu 과발현 세포주에서 Ad-PEG 바이러스에 비하여 세포내로의 유전자 전달효과가 우수하였으며 Ad-PEG-HER의 세포감염경로는 HER2를 매개로 하는 것으로 추정된다. 누드마우스에서 Ad-PEG-HER 바이러스는 단독의 아데노바이러스에 비하여 낮은 중화항체의 생성을 유도하고, Ad 또는 Ad-PEG에 비하여 개선된 항종양효과를 보이는 경향을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
2. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
3. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007;357:2666-76.
4. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1659-72.
5. Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, et al. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369:29-36.
6. Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC, Yoneyama K, Rosenthal ER, Dalemans W, et al. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* 1992;68:143-55.

7. Mittereder N, March KL, Trapnell BC. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol* 1996;70:7498-509.
8. Addison CL, Braciak T, Ralston R, Muller WJ, Gauldie J, Graham FL. Intratumoral injection of an adenovirus expressing interleukin 2 induces regression and immunity in a murine breast cancer model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:8522-6.
9. Descamps V, Duffour MT, Mathieu MC, Fernandez N, Cordier L, Abina MA, et al. Strategies for cancer gene therapy using adenoviral vectors. *J Mol Med* 1996;74:183-9.
10. Kim J, Cho JY, Kim JH, Jung KC, Yun CO. Evaluation of E1B gene-attenuated replicating adenoviruses for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2002;9:725-36.
11. Kim E, Kim JH, Shin HY, Lee H, Yang JM, Kim J, et al. Ad-mTERT-delta19, a conditional replication-competent adenovirus driven by the human telomerase promoter, selectively replicates in and elicits cytopathic effect in a cancer cell-specific manner. *Hum Gene Ther* 2003;14:1415-28.
12. Dyson N, Harlow E. Adenovirus E1A targets key regulators of cell proliferation. *Cancer Surv* 1992;12:161-95.
13. Flint J, Shenk T. Viral transactivating proteins. *Annu Rev Genet* 1997;31:177-212.

14. Whyte P, Ruley HE, Harlow E. Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. *J Virol* 1988;62:257-65.
15. Sladek TL. E2F transcription factor action, regulation and possible role in human cancer. *Cell Prolif* 1997;30:97-105.
16. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36:59-74.
17. Chiou SK, Tseng CC, Rao L, White E. Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. *J Virol* 1994;68:6553-66.
18. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996;18:173-9.
19. Cerni C. Telomeres, telomerase, and myc. An update. *Mutat Res* 2000; 462:31-47.
20. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997;33:787-91.
21. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-5.

22. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992;11:1921-9.
23. Sauthoff H, Hu J, Maca C, Goldman M, Heitner S, Yee H, et al. Intratumoral spread of wild-type adenovirus is limited after local injection of human xenograft tumors: virus persists and spreads systemically at late time points. *Hum Gene Ther* 2003;14:425-33.
24. Harrison D, Sauthoff H, Heitner S, Jagirdar J, Rom WN, Hay JG. Wild-type adenovirus decreases tumor xenograft growth, but despite viral persistence complete tumor responses are rarely achieved--deletion of the viral E1b-19-kD gene increases the viral oncolytic effect. *Hum Gene Ther* 2001;12:1323-32.
25. Unemori EN, Pickford LB, Salles AL, Piercy CE, Grove BH, Erikson ME, et al. Relaxin induces an extracellular matrix-degrading phenotype in human lung fibroblasts in vitro and inhibits lung fibrosis in a murine model in vivo. *J Clin Invest* 1996;98:2739-45.
26. Kim JH, Lee YS, Kim H, Huang JH, Yoon AR, Yun CO. Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1482-93.
27. Delgado C, Francis GE, Fisher D. The uses and properties of PEG-linked proteins. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*

1992;9:249-304.

28. Alemany R, Suzuki K, Curiel DT. Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *J Gen Virol* 2000;81:2605-9.
29. Kreppel F, Kochanek S. Modification of adenovirus gene transfer vectors with synthetic polymers: a scientific review and technical guide. *Mol Ther* 2008;16:16-29.
30. Ogawara K, Rots MG, Kok RJ, Moorlag HE, Van Loenen AM, Meijer DK, et al. A novel strategy to modify adenovirus tropism and enhance transgene delivery to activated vascular endothelial cells in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 2004;15:433-43.
31. Mok H, Palmer DJ, Ng P, Barry MA. Evaluation of polyethylene glycol modification of first-generation and helper-dependent adenoviral vectors to reduce innate immune responses. *Mol Ther* 2005;11:66-79.
32. O'Riordan CR, Lachapelle A, Delgado C, Parkes V, Wadsworth SC, Smith AE, et al. PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 1999;10:1349-58.
33. Eto Y, Yoshioka Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Development of PEGylated adenovirus vector with targeting ligand. *Int J Pharm* 2008;354:3-8.
34. Eto Y, Gao JQ, Sekiguchi F, Kurachi S, Katayama K, Maeda M,

et al. PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high transduction efficiency and antibody evasion ability. *J Gene Med* 2005;7:604-12.

35. Maeda M, Kida S, Hojo K, Eto Y, Gaob JQ, Kurachi S, et al. Design and synthesis of a peptide-PEG transporter tool for carrying adenovirus vector into cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2005;15:621-4.
36. Jung Y, Park HJ, Kim PH, Lee J, Hyung W, Yang J, et al. Retargeting of adenoviral gene delivery via Herceptin-PEG-adenovirus conjugates to breast cancer cells. *J Control Release* 2007;123:164-71.
37. Hall SR. Cocondensation of organosilica hybrid shells on nanoparticle templates: a direct synthetic route to functionalized core-shell colloids. *Langmuir* 2000;16:1454-6.
38. Chen H. An electrochemical impedance immunosensor with signal amplification based on Au-colloid labeled antibody complex. *Sensors and actuators B, Chemical* 2006;117:211-8.
39. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 1997;275:1320-3.
40. Bewley MC, Springer K, Zhang YB, Freimuth P, Flanagan JM. Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* 1999;286:1579-83.

41. Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993;73:309-19.
42. Bai M, Harfe B, Freimuth P. Mutations that alter an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells. *J Virol* 1993;67:5198-205.
43. Lipton JH, Khoroshko N, Golenkov A, Abdulkadyrov K, Nair K, Raghunadharao D, et al. Phase II, randomized, multicenter, comparative study of peginterferon-alpha-2a (40 kD) (Pegasys) versus interferon alpha-2a (Roferon-A) in patients with treatment-naive, chronic-phase chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 2007;48:497-505.
44. Nieforth KA, Nadeau R, Patel IH, Mould D. Use of an indirect pharmacodynamic stimulation model of MX protein induction to compare in vivo activity of interferon alfa-2a and a polyethylene glycol-modified derivative in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1996;59:636-46.
45. Kelleher AD, Roggensack M, Emery S, Carr A, French MA, Cooper DA. Effects of IL-2 therapy in asymptomatic HIV-infected individuals on proliferative responses to mitogens, recall antigens and HIV-related antigens. *Clin Exp Immunol* 1998;113:85-91.
46. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for

human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;
89:4285-9.

Abstract

Development of HER2-targeted and
Systemically Applicable Adenovirus

Joohyuk Sohn

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Joo-Hang Kim)

HER2/neu is 1 of the 4 known epidermal growth factor receptors and is known to be overexpressed in 20–30 % of breast cancer patients, indicating poor prognosis. New drugs are being developed targeting HER2/neu, and Herceptin (Trastuzumab) is regarded as a representative one at present.

The most well-known obstacle for an adenovirus to be developed as an anticancer drug is the limitation to be delivered systemically because of the in vivo immune response. Recently, conjugation of polyethylene glycol (PEG) to the adenovirus (PEGylation) showed increased circulation time in mice, indicating the possibility of systemic administration of the adenovirus as an anticancer therapeutic. However, PEGylation resulted in decreased viral delivery into the cell because of PEG which is coating the virus

outside could prevent the viral contact with the receptors in cell. The current study aimed to increase the systemic viral delivery of this PEGylated adenovirus through by making a ternary structure with Herceptin (trastuzumab) in HER2 positive breast cancer. We used Ad-mTERT- Δ 19-Relaxin as a backbone adenovirus that was developed in our laboratory. It was designed to enhance target specificity using the TERT promoter and increase cellular apoptosis and viral spread through the deletion of the E1B19 gene and the addition of the Relaxin gene in the E3 region. The backbone virus was conjugated with PEG (Ad-PEG) using either dithiobis (succinimidyl-propionate) DSP or dithiobis (sulfosuccinimidyl-propionate) DTSSP as a cross-linker in water or DMSO followed by binding to Herceptin with the cross-linker of 1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide (EDC)/*N*-hydroxysuccinimide(NHS), resulting in a ternary structure named Ad-PEG-HER. The mixtures of the adenovirus only, Ad-PEG, and Ad-PEG-HER were segregated respectively using FPLC. The size of each product was measured using DLS (Zeta-potential Analyzer, Photal, Otsuka, Japan) and showed particles of around 100 nm in size. The size was larger in Ad-PEG-HER, Ad-PEG, and adenovirus only in that sequence. In terms of GFP expression, Ad-PEG showed decreased gene expression compared to Ad but Ad-PEG-HER showed enhanced GFP expression in HER2 positive cell lines such as NIH 3T6.7, MDA-MB-435, and MDA-MB-231. In MTT assay, Ad-PEG-

HER overcame the decreased cytotoxicity of Ad-PEG because of PEGylation. In order to confirm that this effect was mediated through HER2, competition assay was done and showed that Herceptin pretreatment led to decreased GFP expression with Ad-PEG-HER. In a pharmacokinetic study in BALB/c mice, Ad-PEG-HER showed slightly increased circulation time compared to Ad. Analysis of immune response after Ad-PEG-HER treatment showed decreased production of IL-6 and neutralizing antibody. In nude mouse xenograft model, Ad-PEG-HER showed enhanced antitumor activity compared to Ad and Ad-PEG when injected systemically but it was not statistically significant. In conclusion, Ad-PEG-HER seems to be a promising therapeutic in HER2 positive breast cancer but further preclinical and clinical studies are needed to explore its potential.

Key Words: Adenovirus, HER2, PEG, Herceptin,
Cancer gene therapy