

VEGF trap을 발현하는 종양 선택  
적 살상 아데노바이러스에 의한  
항종양효과

연세대학교 대학원

의과학과

신혜원

VEGF trap을 발현하는 종양 선택  
적 살상 아데노바이러스에 의한  
항종양효과

연세대학교 대학원

의과학과

신혜원

VEGF trap을 발현하는 종양 선택  
적 살상 아데노바이러스에 의한  
항종양효과

지도교수 윤채옥

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2009년 12월

연세대학교 대학원

의과학과

신혜원

# 신혜원의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2009년 12월

## 감사의 글

2007년 7월, 암연구소에 학부생 인턴으로서 처음 발을 디디었던 제가 어느새 논문 감사의 글을 작성하고 있다는 사실이 참 벅차고 놀랍습니다. 그 만큼 제가 성장할 수 있었던 것은 제 주위의 선배님들 그리고 제 지도교수이신 윤채옥 교수님의 가르침을 통해서였습니다. 제 인생에 찾아오는 세 가지 기회 중 첫 번째 기회가 저는 암연구소와 제 role model 이신 윤채옥 선생님을 만난 것이라고 생각합니다. 선생님의 지치지 않으시는 열정과 섬세하고 부드럽지만 가끔은 따끔한 사랑의 가르침을 통해 실험과 연구를 하는 자세뿐만 아니라 사람이 지녀야 할 기본적인 덕목과 인품도 배울 수 있었습니다. 잊지 않고 기억하며 부끄럽지 않은 제자가 되겠습니다.

또한 논문심사과정 중 늘 따뜻하고 인자한 미소와 함께 귀중한 가르침 주신 김주향 선생님과 석사의 기본적 소양에 대해 알려 주시고 꼼꼼히 지도해 주신 이재면 선생님, 선생님들의 따뜻하고 소중한 가르침 정말 감사 드립니다.

멋모르던 학부생 시절, 당돌하게 찾아가 부탁 드렸을 때 기꺼이 실험실 생활을 하게 해주셨던 이하규 교수님과 넘치는 에너지로 머리에 속속 들어오는 명강의와 함께 귀찮으셨을 텐데도 즐거이 실험을 가르쳐 주셨던 황혜진 교수님께도 감사를 드립니다.

저를 이끌어 주셨던 여러 선생님들과 더불어 막내의 투정도 기꺼이 받아주고 든든하게 옆에서 힘이 되어준 실험실 식구들에게도 감사의 인사를 전합니다. 연구자로서 내 첫 걸음마를 곁에서 함께 해주고 언제나 힘이 되는 영원한 최고의 싸부 보고 싶은 지영언니, 비슷한 취향으로 하루의 행복한 휴식이자 위로였던 민정언니, 나의 푸근하고 든든한 아빠 곰 지훈오빠, 귀가 길에 수고하신 평환오빠, 정신 없던 마지막 학기를 함께 해 힘이 되어준 늘 쾌활하고 즐거운 아름언니, 실험도 잘

하고 가정일도 잘하는 멋진 나의 선배 정선언니, 퍽퍽대지만 잘 챙겨줬던 삼촌 곶 정우오빠, 친해서 때로는 과했던 내 장난을 잘 받아준 고마운 오준오빠, 하나밖에 없는 사랑하는 동기 지성이 언니, 새로이 시작하는 연이언니, 성경이, 언주, 이제는 졸업해서 잘 볼 수 없는 경주언니, 민주언니, 성미언니 그리고 윤채옥 교수님을 보좌하시는 암연구소의 두 분의 연구교수님 김만복 선생님과 강은아 선생님과 일본에 계시는 만능 재주꾼 김인옥 선생님을 비롯한 암연구소 식구들이 아니었다면 지금의 저는 없었으리라 생각합니다.

멀리 있지만 언제나 마음만은 함께 하는 나의 사랑하는 중앙여고 일레븐 패밀리 지연이, 동미, 보미, 명임이, 남희, 현미, 대학교에서 얻은 소중한 인연 토요일 보람이, 가영이, 지숙이, 영경이, 영선이, 학위과정의 동고동락을 함께 한 수경이와 지선언니 그리고 지희와 보희, 은혜와 정아, 아버지 영범오빠와 큰아버지 윤수오빠. 또 빼놓을 수 없는 나의 오래된 벗 주연이까지. 이들의 응원에 언제나 큰 힘을 얻었습니다. 또한 고민상담의 1인자로 명쾌한 솔루션을 주시는 해결사 현재선배, 연대에서 함께 지내며 잘 챙겨주시고 암연구소로 저를 이끌어준 1등 공신 석환오빠와 혜진언니 덕분에 현명한 선택을 할 수 있었고 무사히 석사과정을 마치게 되었습니다. 그리고 저의 학문적 호기심을 채워주었던 가톨릭대학교 생물학 소모임 MBW의 선, 후배님들에게 감사의 인사를 전합니다.

내 삶의 원동력인 사랑하는 나의 가족 - 존경하는 부모님과 내 동생 승훈이. 저를 향한 사랑과 믿음 그리고 기도에 늘 감사하고 감사하며 말로 표현할 수 없을 만큼 사랑합니다.

마지막으로 항상 곁에서 저를 올바르게 이끄시는 하느님의 인도에 감사하며 글을 맺습니다.

저자 씀

## <차례>

국문요약.....	1
I. 서론.....	3
II. 재료 및 방법.....	7
1. 대상 세포주 및 세포배양.....	7
2. VEGF trap 을 발현하는 아데노바이러스들의 제작, 생산 및 역가 산출.....	7
3. Western blotting.....	9
4. VEGF 발현변화검증.....	9
5. MTT assay.....	10
6. Endothelial cell migration assay.....	10
7. Tube formation assay.....	11
8. Ex vivo aorta ring sprouting assay.....	12
9. VEGF trap-KH903 을 발현하는 종양선택적 살상 아데노바이러스의 세포 살상능 검증.....	12
10. 생체 내 항종양 효과 검증.....	13
11. VEGF 와 결합하는 VEGF trap-KH903 을 발현하는 종양선택적 살상 아데노바이러스 투여에 따른 종양 조직 내 신생혈관형성 억제효과 검증.....	13
13. 종양 내 혈관수의 계산.....	14

### III. 결과

1. VEGF 와 특이적으로 결합하는 VEGF trap KH903 을 발현하는 아데노바이러스의 제작 및 VEGF 발현변화 검증.....	16
2. VEGF 와 특이적으로 결합하는 VEGF trap KH903 을 발현하는 아데노바이러스에 의한 신생 혈관 형성능 검증.....	19
3. VEGF 와 특이적으로 결합하는 VEGF trap KH903 을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 세포 살상능 검증.....	25
4. VEGF 와 특이적으로 결합하는 VEGF trap KH903 을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 생체 내 항종양효과검증.....	27
5. VEGF 발현을 억제하는 KH903을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 투여에 따른 종양 내 혈관 분포 관찰.....	28

### IV. 고찰..... 30

### V. 결론..... 34

### 참고문헌..... 35

### 영문요약..... 39



## 그림 차례

Figure1. Constructs of the adenoviral (Ad) vectors. · .....	16
Figure2. Quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) level showing efficient inhibition of VEGF expression by dE1- k35/KH903. ....	18
Figure3. Inhibition of VEGF-induced proliferation of HUVECs by dE1-k35/KH903. ....	20
Figure4. Effect of dE1-k35/KH903 on human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) migration. ....	21
Figure5. Effect of dE1-k35/KH903 on human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) tube formation. ....	24
Figure6. Inhibition of vessel sprouting by dE1- k35/KH903. ....	25
Figure 7. Cytopathic effects of Ad-ΔB7-KH903 <i>in</i> <i>vitro</i> . ....	26
Figure 8. Anti tumor effect of adenovirus expressing	

KH903..... 27

Figure 9. Histological assessment of angiogenesis in  
the H460 tumor tissue treated with  
RdB/KH903. .... 29

## 국문요약

### VEGF trap을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 의한 항종양효과

신생 혈관 형성은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 자라나는 과정을 말한다. 종양 조직은 2~3 mm 이상 성장하기 위해서 종양 내부의 저산소증을 극복하기 위한 산소와 영양소의 공급이 필수적이기 때문에 이를 위한 무절제한 신생 혈관 형성이 지속적으로 이루어진다. 종양 내 신생 혈관 형성을 매개하는 여러 유도 물질 중 Vascular endothelial growth factor(VEGF)는 가장 중추적인 역할을 하며 VEGF가 중재하는 신생 혈관 형성은 종양의 성장 및 침윤에 중요한 역할을 하기 때문에 항암 치료에 있어서 매력적인 표적이 되고 있다.

VEGF trap은 사람의 IgG의 Fc 부위와 VEGF 수용체인 VEGFR1과 VEGFR2의 VEGF 결합 도메인을 융합시킨 수용성 VEGF 특이적 decoy receptor로써 종양에서 과다하게 분비하는 VEGF에 특이적으로 결합하여 VEGF의 농도를 효과적으로 낮춤으로서 종양 내 신생 혈관 형성을 억제시킬 수 있다. 본 연구에서는 종양 신생 혈관 형성에 가장 중요한 인자로서 영향을 미치는 VEGF를 효과적으로 억제 할 수 있는 VEGF 특이적 수용성 decoy receptor인 KH903을 유전자 전달 효율이 높은 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 삽입하여 이용하였다.

아데노바이러스의 E1부위에 lacZ를 표지 유전자로 도입하고 E3 부분에 KH903을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스를 제작하여 6종류의 폐암 세포주에 감염시키고 배지를 수거하여 VEGF 발현 억제 정도를 VEGF ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)를 수행하여 확인한 결과 실험에 이용한 모든 세포주에서 VEGF양이 확연하게 감

소함을 관찰할 수 있었다. 이어서 VEGF 발현 억제로 인한 혈관 내피 세포 증식능의 감소, 이동능력의 감소를 proliferation assay와 migration assay를 통하여 관찰 하였고, 분화 능력의 감소와 vessel sprouting 감소를 tube formation assay와 aorta ring sprouting assay를 통하여 확인 할 수 있었다. 이와 더불어 아데노바이러스의 E1B 유전자가 소실되고 E1A의 Rb와의 결합능이 소실되고 E1B가 제거된 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 RdB의 E3 부위에 KH903을 삽입하여 제작한 RdB/KH903을 이용하여 H460 xenograft model에서 뛰어난 생체 내 항종양 효과를 확인하였다. 이어서, 혈관 내피세포 표지 인자인 CD31 발현 정도 확인을 통하여 KH903의 종양 조직 내 신생 혈관 억제 효과도 검증할 수 있었다.

결과적으로 VEGF 특이적 decoy receptor인 KH903을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스는 바이러스 자체의 암세포 특이적 복제 및 살상을 유도할 뿐만 아니라 E1A 발현과 KH903의 발현으로 유도된 VEGF 발현 억제로 인해 상승적 항종양 효과를 보이는 RdB/KH903은 항암치료에 유용하게 이용될 수 있을 것이라 생각된다.

---

핵심되는 말 : VEGF, VEGF trap, KH903, 신생 혈관 형성, 아데노바이러스

# VEGF trap을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 의한 항종양효과

<지도교수 윤채옥>

연세대학교 대학원 의과학과

신혜원

## I. 서론

기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 신생 혈관 형성은 정교하게 조절되는 일련의 과정으로 세포외기질(extracellular matrix)과 기저막(basement membrane)의 분해를 통해 시작되며 모세 혈관 내피세포의 분열, 분화, 주변 기질(stroma)로의 침윤, 그리고 새로운 기능적 관 네트워크로의 재 조직화를 통해 완성된다<sup>1</sup>. 신생혈관 형성을 위해서는 여러 종류의 성장인자들이 필요하며 이들 중 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 특히 VEGF-A가 주로 관여함이 밝혀졌다. Alternative splicing을 통해 형성되는 7종류의 인체 VEGF-A isoform(VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF165, VEGF183, VEGF189, VEGF206)들은 각각 121, 145, 148, 165, 183, 189 그리고 206개의 아미노산으로 구성되어 있으며 이 중 VEGF121의 염기서열은 모든 isoform들에 공유되어 있다<sup>2-4</sup>. VEGF와 VEGF 수용체의 결합으로 혈관내피세포의 세포 고사 억제, 림프 신생 혈관 형

성, 면역 억제, vascular permeability, 그리고 조혈모 세포의 생존(hematopoietic stem cell survival) 등이 조절된다<sup>4-7</sup>.

고형암은 혈관이 없는 상태에서 2~3mm 이하의 크기까지 자랄 수 있지만 그 이상의 성장을 위해서는 산소와 영양소의 공급을 위해 VEGF에 의해 매개되는 신생 혈관 형성이 필수적이다. 정상적인 조직에서 혈관 네트워크는 유도인자와 억제인자의 적절한 비율을 통해 효과적인 혈류속도와 고른 혈관들의 너비를 지닌 계층적 구조를 갖추고 있다<sup>8</sup>. 그러나 종양에서 보이는 혈관계는 혈관 벽에 의한 투과성이 증가되어 있고, 높은 내압을 지니고 있으며, 혈관이 커져 있는 등 비정상적으로 발달되어 있다. 종양내 무절제한 신생 혈관 형성 및 비정상적인 혈관의 형태는 종양내부의 저산소증과 낮은 pH에 의해 과발현되는 VEGF와 이의 수용체인 VEGFR2의 결합으로 생성되는 세포내 신호에 의해 발생한다<sup>9</sup>.

VEGF에 의한 신생 혈관 형성은 종양의 성장뿐만 아니라 침윤과 전이에도 중요한 역할을 한다<sup>10</sup>. 폐암, 위암, 신장암, 방광암, 난소암, 그리고 자궁암과 같은 다양한 종양에서 VEGF가 과발현 되어 있음이 밝혀졌고, VEGF의 발현이 높은 암일수록 예후도 좋지 않음이 보고되었다<sup>11</sup>. 종양이 자라나는데 있어 신생 혈관 생성을 통한 혈류 공급의 증가는 필수적이기 때문에 종양 내 혈관 생성 억제는 암 치료의 주요 표적이 되고 있고, angiostatin, endostatin, thrombospondin-1 그리고 uPA-fragment 등이 현재 신생 혈관 생성 억제제로 이용되고 있으며 VEGF의 활성을 억제하거나 VEGF의 세포 수용체인 VEGFR-1(Flt-1) 또는 VEGFR-2(KDR)의 기능을 억제함으로써 종양의 성장을 억제하거나 전이를 억제하는 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>12-16</sup>. 세포내뿐만 아니라 세포외에서도 VEGF와 세포 수용체와의 결합을 저해할 수 있는 중화항체 및 VEGFR-1 또는 VEGFR-2 특이적 중화항체들을 누드마

우스에 형성된 human tumor xenografts에 처리한 경우, 혈관내피세포의 세포고사를 유도하고 종양의 성장을 현저하게 억제하였다<sup>17</sup>.

VEGF trap은 세포 표면에 있는 VEGFR1과 VEGFR2의 도메인을 결합하여 제작한 수용성 decoy VEGF receptor로서 VEGF와 높은 친화력을 가지고 있다. 현재까지 VEGF trap에 관한 많은 연구가 진행되고 있으며 그에 따라 VEGF-A, VEGF-B, 그리고 placental growth factor(PGF)에 대한 친화력이 더 증가된 VEGF trap들이 제작되었다<sup>18</sup>. 여러 tumor xenograft model들에서 진행된 전 임상 시험에서 VEGF trap의 항종양 효과가 검증되었으며<sup>19-21</sup>, VEGF trap 또는 항암제 각각을 처리했을 때에 비해 상용적으로 이용되는 항암제와의 병합치료 시 향상된 종양 성장 억제 효과를 볼 수 있었다<sup>22</sup>. VEGF trap이 VEGF 단일 클론 항체인 bevacizumab 이나 VEGFR2 항체인 DC101에 비해 우수한 항종양 효과를 보이는 이유는 모든 VEGF isoform들과의 높은 친화력뿐만 아니라 VEGF subfamily 중 PGF와의 결합능도 가지고 있기 때문이다<sup>23</sup>. 따라서 VEGF와 친화력이 강한 VEGF trap을 종양내에서 지속적으로 발현시켜 준다면 종양에서 분비되는 VEGF의 발현양을 현저히 감소시켜 뛰어난 항종양 효과를 나타낼 수 있으며 이를 통해 상당한 치료 효과를 보일 것으로 기대된다.

아데노바이러스는 우수한 유전자 전달 효율을 나타내며 높은 역가로 생산이 가능하고 쉽게 농축할 수 있기 때문에 암 유전자치료를 위한 유전자 전달체로 각광을 받고 있다<sup>24-25</sup>. 그러나 아데노바이러스를 이용한 암유전자 치료제가 임상적으로 이용되기 위해서는 주변의 정상조직의 세포에는 부작용 없이 암 세포만을 선택적으로 살상할 수 있는 특이성과 동시에 암세포를 효과적으로 사멸시킬 수 있는 살상능이 높은 아데노바이러스의 개발이 필수적이다. 종양 세포에서는 p53 단백질의 변이뿐 아니라 retinoblastoma 단백질(pRb)의 변이가 빈번하거나

혹은 pRb 관련 신호기전이 상당부분 손상되어 있기 때문에, pRb와의 결합능이 소실된 아데노바이러스는 정상 세포에서는 pRb의 활성화로 아데노바이러스의 복제가 억제 되지만 pRb의 기능이 억제된 종양 세포에서는 활발하게 복제되어 암세포를 선택적으로 살상할 수 있다. 이러한 배경 하에, 본 연구실에서는 종양 특이적 살상 아데노바이러스의 암세포 특이적 복제능을 증진시키기 위하여, 아데노바이러스의 E1A 유전자 부위 중 pRb과의 결합에 관여하는 CR1 부위의 Glu 아미노산을 Gly로 치환시키고 CR2 부위의 7개 아미노산(DLTCHEA)을 Gly(GGGGGGG)으로 치환시킴으로서 pRb와의 결합능이 소실되고, 동시에 p53 단백질의 기능을 억제하는 E1B 55kDa과 세포고사 억제 기능을 하는 E1B 19kDa 유전자를 제거함으로써, p53 이 불활성화된 종양세포들에서만 선택적으로 복제가 가능하고 이에 따른 암세포 특이적 세포 살상 및 세포고사를 함께 유발할 수 있는 개선된 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 Ad- $\Delta$ B7을 제작하여, 우수한 생체 내·외 항종양 효과를 보고한 바 있다<sup>26-28</sup>.

이러한 배경 하에, 본 연구에서는 VEGF와 특이적으로 결합하는 수용성 decoy VEGF receptor인 VEGF trap-KH903 유전자를 종양 선택적으로 복제 가능한 아데노바이러스에 삽입하여 바이러스의 복제에 따른 암세포 특이적 살상 효과와 더불어 VEGF trap을 암세포 특이적으로 장기간 고 발현 시켜줌으로써 신생 혈관 형성 억제에 의한 항암 효과를 동시에 유도했을 때 총체적인 항종양 효과가 향상되는지를 알아보고자 하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 대상 세포주 및 세포배양

실험에 사용된 세포주들은 인체 폐암 세포주인 A549와 H460로 모두 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고 Human umbilical vascular endothelial cell(HUVEC)은 연세대학교 생화학과 권영근 선생님께서로부터 받았으며, 아데노바이러스 초기 발현 유전자인 E1 부위가 숙주 유전체 내에 내재되어 있는 HEK293 세포주(ATCC)를 아데노바이러스 생산 세포주로 사용하였다. HUVEC 세포를 제외한 모든 세포주들은 10%의 우태아 혈청(FBS; Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)이 포함된 DMEM 배양액으로 항생제 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin(Gibco-BRL)을 첨가하여 5% CO<sub>2</sub> 의 존재 하에 37°C 항온 배양기에서 배양하였다. HUVEC 세포는 5% FBS가 포함된 EGM-2MV(Lonza, Walkersville, MC, USA) 에 항생제 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin(Gibco-BRL)을 넣고 배양한 계대 배양 5-8 사이의 세포들로 실험을 하였다.

### 2. KH903을 발현하는 아데노바이러스들의 제작, 생산 및 역가산출

KH903을 발현하는 재조합 아데노바이러스를 제작하기 위하여 KH903 플라즈미드인 pKH903(Kang Hong, Cheng du, China)를 아데노바이러스 E1 셔틀벡터인 pCA14에 EcoRI으로 삽입한 뒤 이를 다시 BgIII로 잘라 얻어진 KH903 DNA 절편을 BamHI으로 자른 E3 셔틀벡터 pSP72ΔE3에 삽입하였다. 제작된 pSP72ΔE3/KH903 벡터를

XbaI으로 잘라 pSP72ΔE3/CMV 벡터의 CMV promoter를 삽입하였다. KH903을 발현하는 복제 불능 아데노바이러스를 제작하기 위하여, 상기에서 제작된 pSP72ΔE3-CMV-KH903 E3 셔틀벡터를 PvuI으로 처리하여 선형화시키고, E3 유전자가 소실되고 E1부위에 lacZ가 삽입되어 있으며 아데노바이러스 타입35의 파이버 knob으로 치환된 pdE1-k35 토탈벡터를 Spe I 제한효소로 처리하여 선형화시켰다. 이들을 함께 대장균 BJ5183 (obtained from S.B. Verca, University of Fribourgh, Switzerland)에서 동시 형질 전환시켜 유전자 상동 재조합 (homologous recombination)을 유도하여 lacZ 유전자와 KH903을 동시에 발현하는 복제 불능 아데노바이러스 벡터인 pdE1-k35/KH903를 제작하였다. VEGF를 효과적으로 억제시킬 수 있는 VEGF trap을 발현하는 종양 특이적 살상 아데노바이러스를 제작하기 위해서는, 상기에서 제작된 pSP72ΔE3-CMV-KH903 E3 셔틀벡터를 PvuI으로 처리하여 선형화시킨 뒤, Spe I 제한효소를 처리하여 선형화 시킨 pRdB 아데노바이러스 토탈 벡터(E1A의 Rb 결합 부위가 변이되고, E1B 19 KDa 유전자와 E1B 55 KDa 유전자가 함께 소실된 종양 특이적 살상 아데노바이러스)와 함께 대장균 BJ5183에서 동시 형질 전환시켜 pRdB/KH903 종양 선택적 살상 아데노바이러스 벡터를 제작하였다. 상동 재조합된 아데노바이러스 벡터들을 HindIII 제한효소로 처리하여 상동 재조합 유무를 확인한 후, 확인된 플라즈미들은 Pac I 제한효소로 절단한 뒤 HEK293 세포주에 형질 전환시켜 아데노바이러스를 생산하였다. 대조군으로 사용된 바이러스는 E1 부위의 유전자들이 결손 되고 그 부위에 lacZ 유전자를 가진 dE1-k35 와 동시에 E1B 19 kDa와 E1B 55 kDa 유전자들이 모두 결손된 RdB이며, 각각의 아데노바이러스는 HEK293 세포주에서 증식시켜 CsCl gradient로 농축시켜 순수 분리하였으며, limiting titration assay 와 photospectrometer로 역가

(plaque forming unit; PFU)를 산출하였다.

### 3. Western blotting

KH903을 발현하는 바이러스가 인체 폐암 세포주에 감염되었을 때 세포 내에서 KH903 단백질이 생성되어 세포 배양액으로 분비되어 나오는 지를 검증하기 위하여 A549세포에 제작한 아데노바이러스인 dE1-k35/KH903을 20, 50, 100 MOI로 각각 처리하고 48 시간 뒤에 세포 배양액과 세포를 모두 수거하여 SDS-PAGE(sodium-dodecyl sulfate poly-acrylamide gel electrophoresis)를 시행하였다. 전기영동 후 gel에 있는 단백질을 PVDF(polyvinylidene fluoride) membrane에 전기 이동(electro-transfer) 시킨 후, KH903의 구조 중 human IgG Fc region을 특이적으로 인지하는 항체를 일차 항체(Cell signaling, Danvers, MA, USA)로 결합시켰다. HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 goat anti-mouse IgG 를 이차항체로 반응시킨 뒤, ECL(enhanced chemiluminescence) (Pierce, Rockford, IL, USA) 방법으로 LAS4000을 이용하여 membrane 상의 단백질과 항체와의 결합 여부를 조사하고 각 단백질의 발현양상을 확인하였다.

### 4. VEGF 발현변화

종양에서 분비되는 VEGF를 효과적으로 억제할 수 있는 KH903을 발현하는 아데노바이러스에 의해 VEGF의 발현이 감소되는지를 검증하기 위하여, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 시행하였다. 먼저 VEGF의 발현이 효과적으로 억제되는지를 검증하기 위하여 폐암세포주인 A549, H460, H322, H358, H1299 를 6 well plate에 각

각  $3 \times 10^5$  cells/well으로 분주한 뒤 다음날 아데노바이러스를 2~100의 multiplicity of infection(MOI)로 감염시키고 6 시간 후 5% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교체하였다. 바이러스 감염 후 48 시간에 배지를 회수하기 위하여, 배지 회수 24 시간 전에 FBS가 포함되지 않은 DMEM으로 교체하였다. 회수된 배지는 800 g로 원심 분리하여 상층액을 분리한 뒤, 이 중 150  $\mu$ g을 이용하여 VEGF ELISA 분석을 시행하였다.

## 5. MTT assay

아데노바이러스 감염에 따른 KH903의 발현에 의한 혈관 내피 세포 증식능의 억제를 정량화하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, 2 mg/ml) assay를 수행하였다. HUVEC을 2% gelatin으로 coating된 48-well plate에 분주하고 24 시간 후 30 MOI의 제작한 재조합 아데노바이러스를 처리하였다. 바이러스 처리 전 HUVEC은 EBM-2(Lonza, Walkersville, MC, USA) 배지로 혈청 starvation을 주었다. 바이러스 처리 후 72 시간 후에 세포의 생존율을 측정하기 위해 배지를 제거한 후, MTT 용액을 각 well 당 150  $\mu$ l을 넣고 5% CO<sub>2</sub>의 존재 하에 37°C 항온 배양기에서 4 시간 동안 반응시킨 후 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 plate well에 1 ml의 DMSO(dimethyl sulphoxide)를 첨가하고 37°C에서 10 분간 반응시킨 후, DMSO로 용출된 상층액을 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포의 상대적 생존율을 측정하였다.

## 6. Endothelial cell migration assay

HUVEC의 chemotactic motility를 알아보기 위하여 6.5-mm diameter polycarbonate filters(8- $\mu$ m pore size) 의 Transwell(Corning Costar, Cambridge, MA, USA)을 이용하여 endothelial cell migration assay를 진행하였다. 먼저, upper chamber의 filter에 0.1% gelatin을 이용해 코팅하였다. Gelatin이 다 마르면 6시간 동안 serum-free 배지에서 배양하여 혈청 starvation을 준 HUVEC을  $1 \times 10^5$  cells로 counting 하여 upper chamber에 넣고 dE1-k35와 dE1-k35/KH903 아데노바이러스를 감염시켜 수거한 세포 배양액을 lower chamber에 넣고 plate는 37°C에서 3시간 30분 동안 배양시켰다. 3시간 30분 후 plate를 꺼내 upper chamber의 media를 따라낸 후 세포를 methanol로 1분간 fixing하고 H & E 염색을 하여 slide를 제작하였다. 이후에 group별로 200배의 배율에서 여덟 군데의 사진을 찍어 평균을 구해 세포의 이동성을 정량화하였다.

## 7. Tube formation assay

중양에서 분비되는 VEGF를 효과적으로 억제할 수 있는 KH903에 의한 VEGF의 발현 감소로 혈관 내피 세포의 tube formation 기능이 변화되는지를 알아보기 위하여, HUVEC을 이용한 tube formation assay를 시행하였다. 먼저 250  $\mu$ l의 growth factor-reduced matrigel(Collabo-rative Biomedical Products, Bedford, MA, USA)를 미리 -20°C에 넣어둔 24-well plate에 균일하게 분주한 뒤, 37°C에서 30분간 굳혔다. HUVEC(5-7 계대 배양) 세포는 6시간 동안 serum-free EBM-2(Lonza, Walkersville, MC, USA) 배지에서 배양하여 혈청 starvation 시킨 뒤, trypsin을 처리하여 세포 수를 측정하였

다. dE1-k35 또는 dE1-k35/KH903 아데노바이러스를 각각 20 MOI 처리한 후 48 시간 후에 수득한 A549, H460 세포 배양액을 혈청 starvation 전 처리가 된 HUVEC( $1.5 \times 10^5$  cells/well)세포와 섞은 뒤, matrigel이 분주된 24-well plate에 분주하고 배양하였다. 양성 대조군으로는 20 ng/ml의 VEGF 단백질을 이용하였다. 배양 후 12 시간에서 16 시간 사이에 배양액을 제거하고 PBS로 2번 세척한 뒤 현미경으로 tube 형성을 관찰하였다.

### 8. Ex vivo aorta ring sprouting assay

종양에서 분비되는 VEGF를 효과적으로 억제할 수 있는 KH903에 의한 혈관 형성 억제를 관찰하기 위하여, aorta ring sprouting assay를 시행하였다. 오리엔트(Orient Bio, Korea, Inc.)에서 구입한 6 주령의 Sprague Dawley rat으로부터 aorta를 분리하고, aorta 주변의 fibro-adipose tissue를 제거한 뒤, 1 mm 두께의 ring으로 얇게 잘랐다. 미리 차갑게 해둔 48-well plate에 matrigel을 200  $\mu$ l씩 분주하고 aorta ring을 각각의 well 안의 matrigel에 심어준 후 37°C에서 20 분간 굳혔다. 30 분 후 matrigel이 굳으면, tube formation assay에서 사용되었던 세포 배양액 250  $\mu$ l를 각각의 well에 처리하여 배양 하고 매일 현미경으로 aorta ring으로부터 생성되어진 혈관들을 관찰하였다. 양성 대조군으로는 VEGF 단백질(20 ng/ml)을 처리하였다. 배양 후 새로 형성된 혈관들은 double-blinded manner로 양성 대조군을 5점, 혈관이 형성되지 않은 실험군을 0점으로 점수를 부여하여 분석하였으며, 각각의 실험군에 대해 12개의 aorta ring을 대상으로 aorta ring sprouting assay를 수행하였다.

## 9. KH903을 발현하는 종양선택적 살상 아데노바이러스의 세포살상능 검증

종양에서 분비된 VEGF를 감소시키는 KH903의 발현 여부가 아데노바이러스의 복제에 어떠한 영향을 미치는지 검증하기 위하여, cytopathic effect(CPE) assay를 수행 하였다. 폐암 세포주를 포함한 인체 종양 세포주들을 48-well plate에 각각 분주하고, 24 시간 후 dE1-k35, dE1-k35/KH903, RdB, 또는 RdB/KH903 아데노바이러스를 0.1~10 MOI로 감염시켰다. 대조군 바이러스와의 차이가 가장 두드러지는 시점에 배지를 제거하고 plate 바닥에 남아있는 세포들을 0.5% crystal violet 으로 고정하고 염색한 후 분석하였다.

## 10. 생체 내 항종양 효과 검증

오리엔트에서 구입한 생후 6~8 주 정도 경과된 누드 생쥐 복부 피하에  $1 \times 10^7$  개의 인체 폐암 세포주 H460을 주사하였다. 종양의 용적이 약 70~100 mm<sup>3</sup> 정도 되었을 때, RdB, RdB/KH903 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS와 함께 각각 이틀 간격으로 세 번 종양 내에 직접 주사한 후 종양의 크기를 이틀 간격으로 측정하였다. 종양의 용적은 caliper로 종양의 단축과 장축을 측정하여 다음과 같은 공식으로 산출하였다.

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

## 11. VEGF와 결합하는 KH903을 발현하는 종양선택적 살상 아데노바이러스 투여에 따른 종양 조직 내 신생혈관형성 억제효과 검증

6~8 주령의 누드 생쥐 복부 피하에 폐암 세포주인 H460를 주사한 후 종양의 크기가 약 100~120 mm<sup>3</sup> 정도 되었을 때, RdB, RdB/KH903 아데노바이러스 또는 음성 대조군인 PBS를 이틀 간격으로 3회 종양 내 투여하였다. 마지막 바이러스를 투여한 후 10 일경에 종양을 적출하여 IHC zinc fixative(Formalin-free) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) 용액에 고정시킨 뒤 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록을 4 μm 두께로 잘라 슬라이드로 만든 뒤, 이를 xylene, 100%, 95%, 80%, 70% ethanol 용액에 차례로 담궈 파라핀을 제거(deparafinization)한 후 hematoxylin과 eosin(H & E)으로 염색하였다. 종양이 분비하는 VEGF와 결합하여 발현을 감소시키는 KH903에 의하여 종양 조직 내 혈관 형성이 억제 되었는지 확인하기 위하여, 혈관 내피 세포 특이적 항원인 CD31을 선택적으로 인지할 수 있는 항체인 rat anti-mouse CD31 monoclonal antibody(MEC13.3; BD Biosciences Pharmingen)를 이용하여 조직 면역 염색을 시행하였다. 파라핀이 제거된 4 μm 두께의 종양 조직 슬라이드를 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 10 분간 반응시켜 내인성 과산화 효소의 작용을 차단시키고, Protein Block Serum free(DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA)으로 30 분간 비특이적인 항체 반응이 일어나지 않도록 한 후, CD31 항체를 일차 항체로 hybridization시켰다. Biotin이 결합된 polyclonal anti-rat IgG antibody(BD Biosciences Pharmingen)를 이차 항체로 hybridization시킨 뒤 DAB(DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA)을 이용하여 CD31의 발현 양상을 규명하였다.

## 12. 종양 내 혈관수의 계산



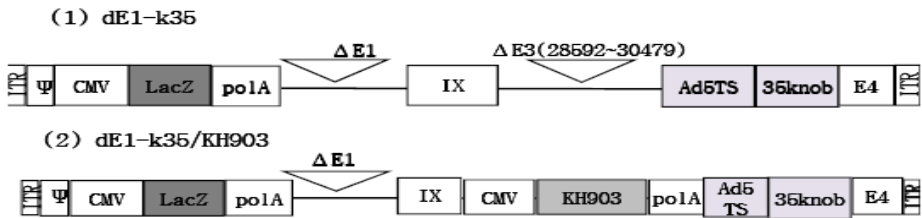
혈관 내피 세포 특이적 항원인 CD31(platelet endothelial cell adhesion molecule1) 양성으로 염색된 종양 내 혈관을 먼저 저배율로 관찰하여 무작위로 사진을 찍은 후, 배율을 높여 100 배 시야에서 관찰되는 혈관의 수를 정량 하였다. 세 장의 슬라이드로부터 각각 5개 시야를 선택하여 혈관 수를 계산하고 평균값을 산출하여 그 값을 대표 값으로 사용하였다.

### III. 결과

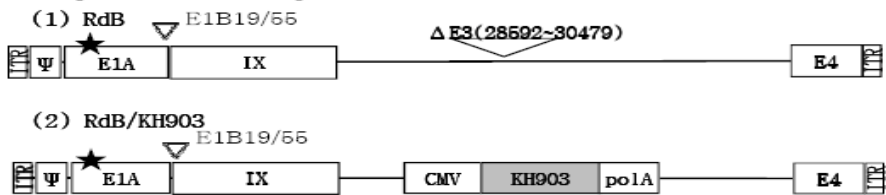
#### 1. VEGF 와 특이적으로 결합하는 KH903 을 발현하는 아데노바이러스의 제작 및 VEGF 발현변화 검증

VEGF 에 특이적으로 결합하여 종양에서 분비하는 VEGF 의 발현을 억제하는 VEGF trap 인 KH903 을 발현하는 아데노바이러스 dE1-k35/KH903 를 제작하였다(Fig. 1A).

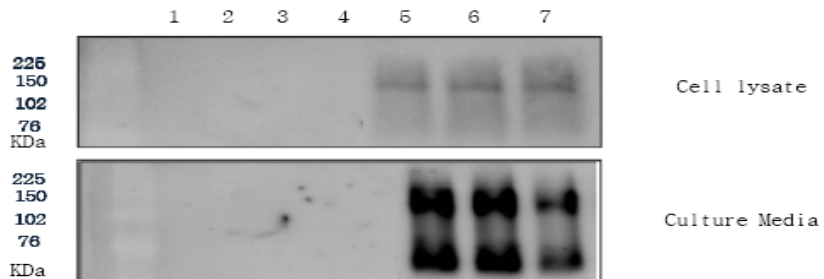
##### A. Replication incompetent Ad



##### B. Replication competent Ad



##### C. Detection of Secreted KH903.



1: uninfected 2: dE1-k35 20MOI 3: dE1-k35 50MOI  
 4: dE1-k35 100MOI 5: dE1-k35/KH903 20MOI  
 6: dE1-k35/KH903 50MOI 7: dE1-k35/KH903 100MOI

Figure 1. Constructs of the adenoviral (Ad) vectors. (A) E1-deleted replication-incompetent Ads. dE1-k35 expresses  $\beta$ -galactosidase under the control of the cytomegalovirus(CMV) promoter, dE1-k35/KH903 expresses KH903 in the E3 region. (B) Oncolytic Ads. RdB contains mutated E1A, but lacks E1B 19 and 55 kDa; RdB/KH903 expresses KH903 in the E3 region. (C) Detection of KH903 secreted from cell to media. Ad; adenovirus ; ITR, inverted terminal repeat.

dE1-k35/KH903 아데노바이러스의 E3 region 에 삽입된 KH903 이 세포감염 시 실제 세포에서 형성되어 배지로 분비되는지 확인하고자 감염시켰던 종양세포와 배지를 모두 수거하여 KH903 의 구조 중 human IgG 의 Fc region 을 detection 하는 항체를 이용하여 western blotting 을 진행하였다. 실험 결과, cell lysate 에서는 KH903 의 생성을 확인 할 수 있을 정도의 양이 관찰되었으나 culture media 에서는 많은 양의 KH903 을 관찰할 수 있었다. 이를 통해 KH903 은 감염된 세포 내에서 생성되어 배지로 분비되어 나오는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1C).

아데노바이러스의 초기 유전자인 E1A 를 발현하는 복제 가능 아데노바이러스에 의하여 VEGF 의 발현이 감소된다는 보고에 따라 <sup>28</sup>, KH903 에 의한 VEGF 발현 변화를 검증하기 위하여, E1A 가 소실되고 lacZ 유전자와 KH903 을 동시에 발현하는 복제 불능 아데노바이러스인 dE1-k35/KH903 을 제작하였다. dE1-k35/KH903 을 인체 폐암 세포주들(A549, H460, HCC827, H1299, H2172, H322)에 감염시키고, 세포로부터 배지를 회수하여 ELISA 를 통하여 VEGF 발현 양을 정량하였다. 그 결과, 실험에 이용된 모든 종류의 폐암 세포주에서 dE1-k35/KH903 아데노바이러스의 감염에 의해 VEGF 의 발현이 현

저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A).

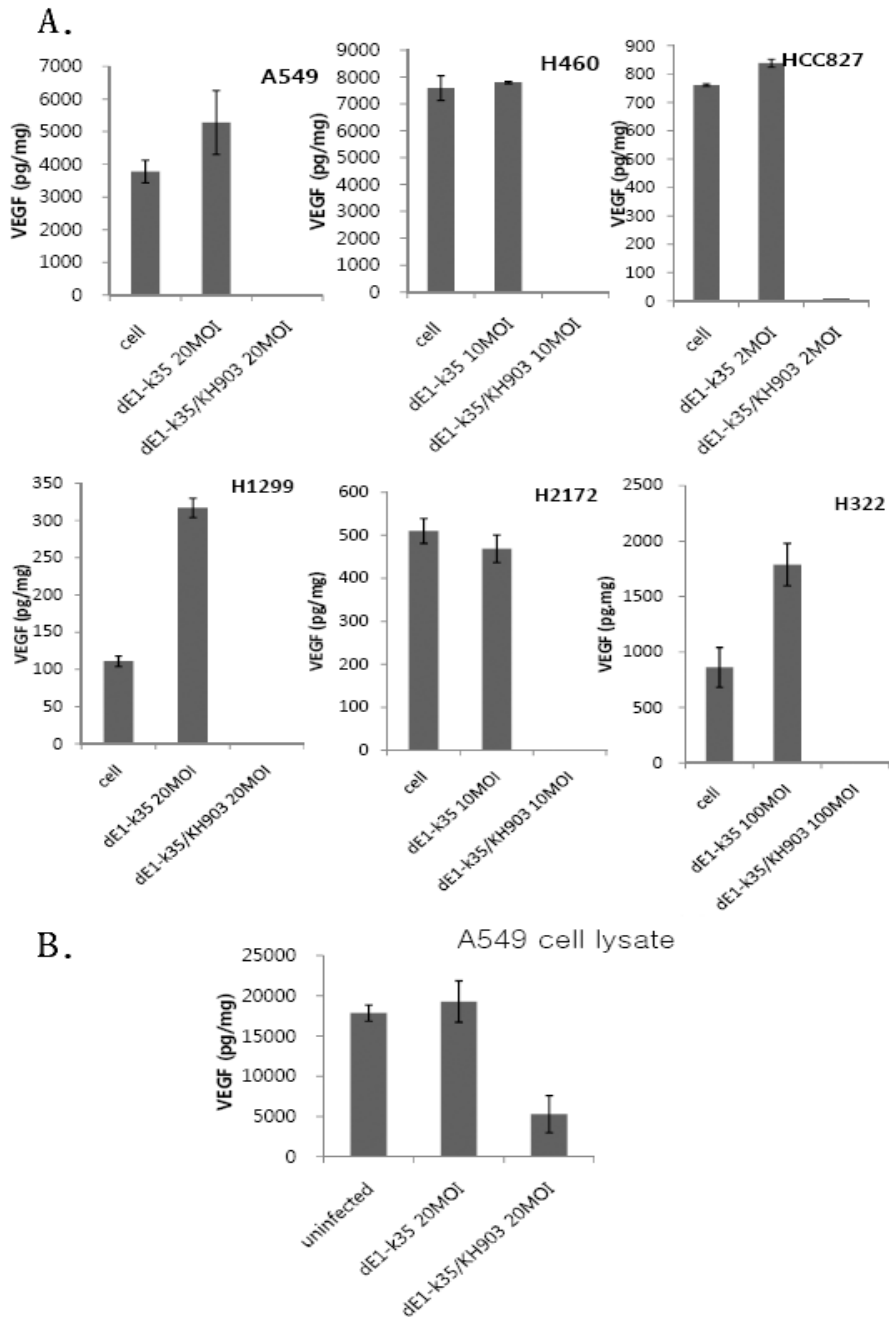


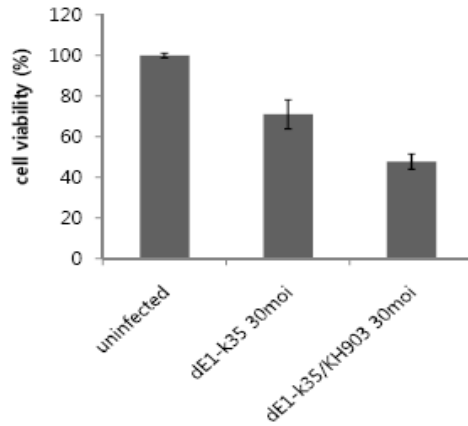
Figure 2. Quantification of VEGF level showing efficient inhibition of VEGF expression by dE1-k35/KH903. (A) Various human lung cancer

cell lines were infected either dE1-k35 or dE1-k35/KH903 at 20-100 MOI. VEGF concentration was measured in the culture supernatant 48 h after infection by conventional ELISA. (B) VEGF expressed in the A549 cell lysate.

실제 종양 세포에서 VEGF 가 얼마나 생성되고 있으며 분비되는 VEGF 가 KH903 발현에 의해 감소하는 것을 검증하기 위해 배지를 수거하고 난 세포를 lysis 하여 세포에서 VEGF 발현양을 확인하였다. Figure 2B 에서 보는 바와 같이, 아데노바이러스 감염 후 배지를 이용해 수행했던 VEGF ELISA 의 결과와 마찬가지로 dE1-k35 을 감염시킨 세포에 비해 dE1-k35/KH903 을 감염시킨 세포에서 VEGF 발현양이 확연하게 감소한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B).

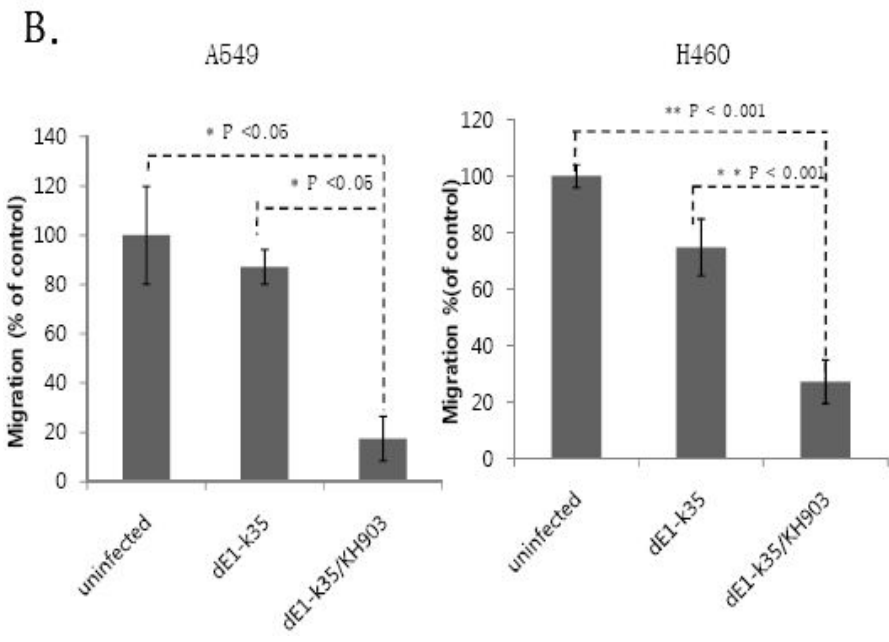
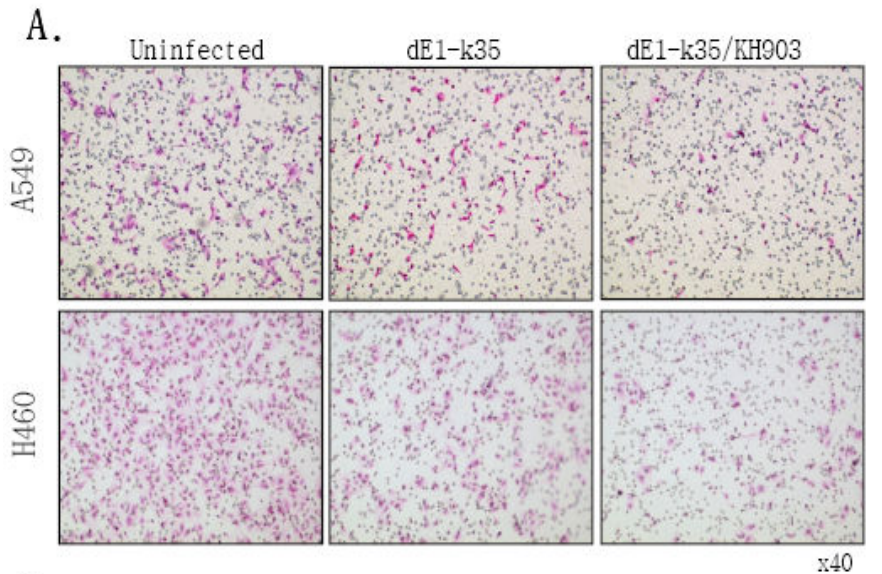
## 2. VEGF 와 특이적으로 결합하는 KH903 을 발현하는 아데노바이러스에 의한 신생 혈관 형성 억제능 관찰

먼저, VEGF 를 억제시키는 KH903 의 발현으로 인한 VEGF 농도의 변화가 HUVEC 의 VEGF-induced proliferation 에 대한 영향을 확인하였다. HUVEC 을 matrigel-coated 48well plate 에  $2 \times 10^4$  cells/well 로 seeding 후 30 MOI 의 dE1-k35 또는 dE1-k35/KH903 아데노바이러스로 감염시키고 72 시간 후 MTT assay 를 수행하여 살아있는 세포의 생존율을 측정하였다. 그 결과, dE1-k35/KH903 을 감염시킨 group 에서 바이러스를 처리하지 않은 group 에 비해서 생존율이 53% 감소하였으며 양성 대조군인 dE1-k35 을 감염시킨 group 에 비해서는 30% 감소한 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).



**Figure 3.** Inhibition of VEGF-induced proliferation of HUVECs by dE1-k35/KH903. HUVECs were treated dE1-k35 or dE1-k35/KH903 at an MOI of 30. After 72 h from infection, MTT assay was performed to measure total viable cells. The results are the mean of triplicate experiments.

VEGF 발현을 억제시키는 KH903 으로 인한 VEGF 양의 변화가 혈관 내피 세포의 이동 능력에 미치는 영향을 검증하기 위하여, HUVEC 세포를 이용하여 migration assay 를 시행하였다. A549, H460 세포주를 20 MOI 의 dE1-k35 또는 dE1-k35/KH903 아데노바이러스로 각각 감염시키고 48 시간 뒤에 수득한 배지로 HUVEC 세포를 배양하였다. 그 결과 아무 것도 처리하지 않은 세포 배양액 또는 dE1-k35 아데노바이러스를 감염시킨 세포 배양액을 처리한 경우에는 upper chamber 에서 lower chamber 로 많은 세포가 이동한 반면, dE1-k35/KH903 아데노바이러스를 감염시킨 세포 배양액을 처리한 경우에는 HUVEC 세포들의 이동이 위의 두 group 에 비해 잘 되지 않음을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

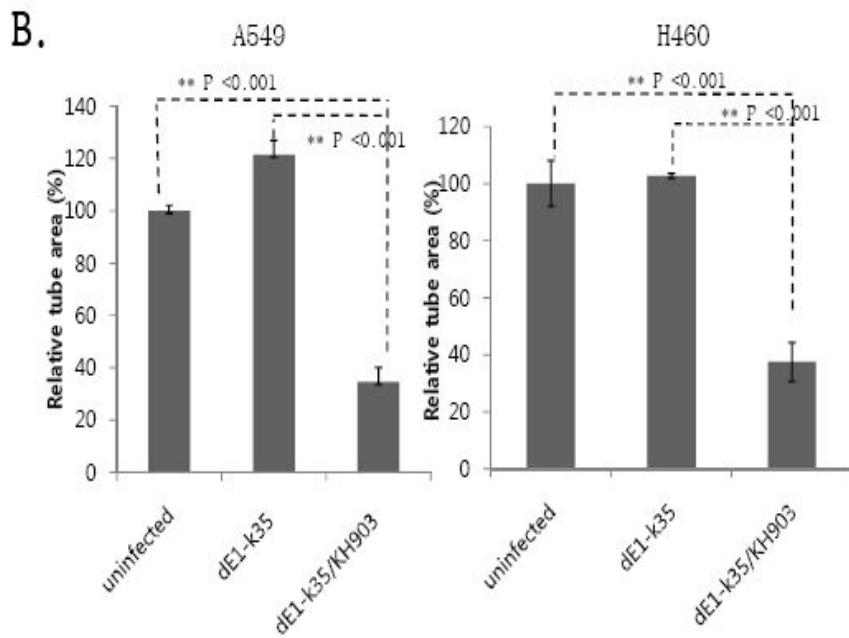
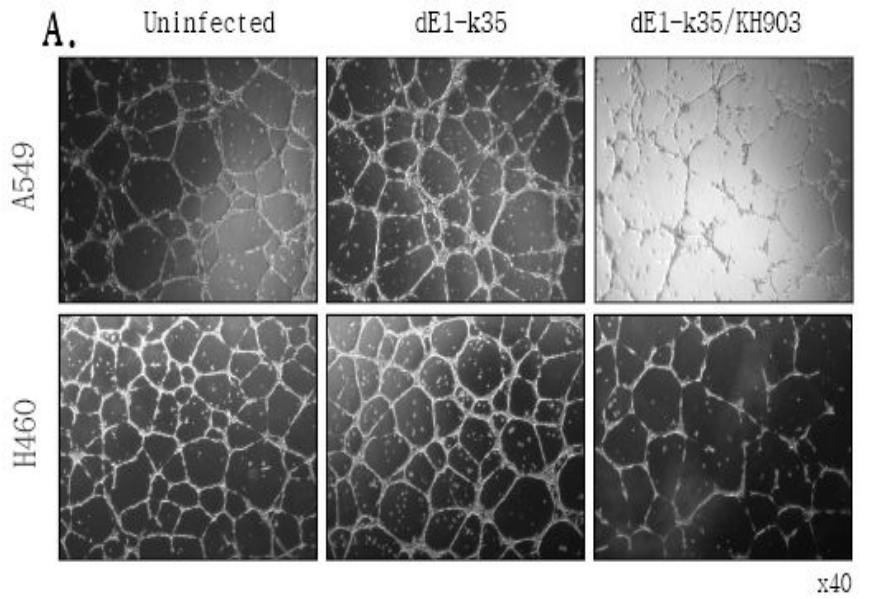


**Figure 4.** Effect of dE1-k35/KH903 on HUVEC migration. Cells were overlaid in the upper chambers of 24-well tissue culture plates containing EBM. After incubation for 3.5 h, penetrating cells were fixed and stained with Hematoxilyn and Eosin(H&E). (A)

Representative photographs of HUVECs migration (x40). (B) Migratory cells are represented as the number of migrated cells per high-power field (x200). Eight fields were counted in duplicate from each sample. Error bars represent  $\pm$ s.e. \* $P$ <0.05, \*\*  $P$ <0.001.

KH903 의 발현으로 인한 VEGF 양의 변화가 혈관 내피 세포의 혈관 형성 능력에 미치는 영향을 검증하기 위하여, HUVEC 세포를 이용하여 tube formation assay 를 시행하였다. A549, H460 세포주를 20 MOI 의 dE1-k35 또는 dE1-k35/KH903 아데노바이러스로 각각 감염시키고 48 시간 뒤에 수득한 배지로 HUVEC 세포를 배양하였다. 그 결과 아무 것도 처리하지 않은 세포 배양액 또는 dE1-k35 아데노바이러스를 감염시킨 세포 배양액을 처리한 경우에는 크고 굵은 tube 가 형성된 반면 dE1-k35/KH903 아데노바이러스를 감염시킨 세포 배양액을 처리한 경우에는 HUVEC 세포들의 혈관 형성이 잘 되지 않아 가늘고 부분적으로 끊어진 tube 가 형성된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

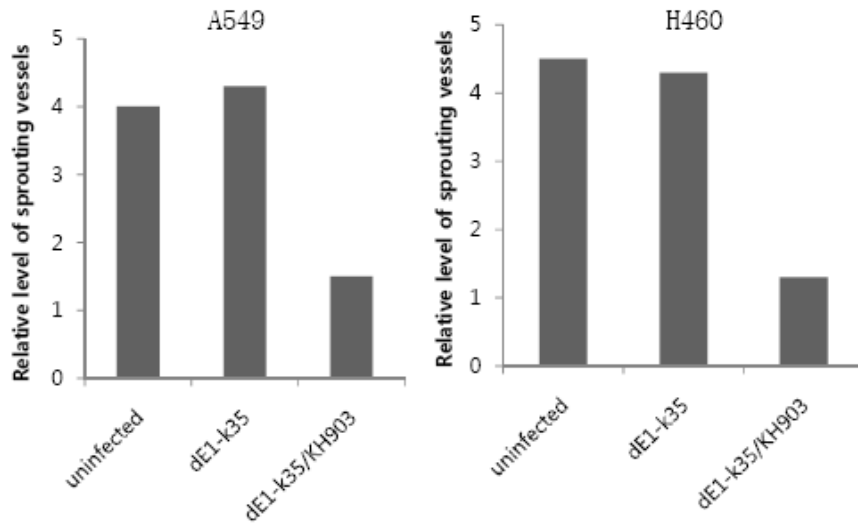




**Figure 5.** Effect of dE1-k35/KH903 on HUVEC tube formation. HUVECs were plated on matrigel-coated plates at a density of  $1.5 \times 10^5$  cells/well and then incubated with the conditioned media of dE1-k35

or dE1-k35/KH903 infected A549, H460 at 20 MOI for 48 h. (A) Representative photographs of tube formation (x40). (B) Quantitative analysis of tube formation. Quantification of tube formation was carried out by measuring the area covered by the tube network using an Multi Gauge. Experiments were repeated three times and values are means of triplicate measurements from one representative experiment; error bars represent  $\pm$  s.e. \* $P$ <0.05, \*\*  $P$ <0.001.

이상에서 확인된 신생 혈관 형성능의 차이를 *ex vivo* 상에서 확인하기 위하여, rat의 aorta를 이용하여 vessel sprouting assay를 수행하였다. 먼저, dE1-k35 또는 dE1-k35/KH903 아데노바이러스를 20 MOI로 처리하고 48시간 뒤에 회수한 A549, H460 세포 배양액을 aorta ring에 처리하고 5일 동안 배양한 결과, 아무것도 처리하지 않은 세포 배양액이나 dE1-k35를 감염시킨 A549 세포 배양액을 처리한 aorta ring과는 대조적으로, dE1-k35/KH903 아데노바이러스를 처리한 세포 배양액으로 aorta ring을 배양한 경우에 vessel sprouting이 거의 일어나지 않은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 이를 보다 정량적으로 비교 검증하기 위하여, 형성된 혈관들을 double-blinded manner로 양성 대조군(most positive)을 5점, 혈관이 sprouting되지 않은 실험군(least positive)을 0점으로 점수를 부여하여 분석하였다. 아무 것도 처리하지 않은 세포 배양액이나 dE1-k35를 감염시킨 A549, H460 세포 배양액을 처리한 모든 aorta에서 혈관형성이 활발하게 일어남을 확인할 수 있었으나, dE1-k35/KH903 아데노바이러스를 감염시킨 세포의 배양액을 처리한 경우에는 혈관만이 sprouting되어 대조군 바이러스인 dE1-k35에 비해 혈관 형성이 현저하게 억제됨을 확인하였다.

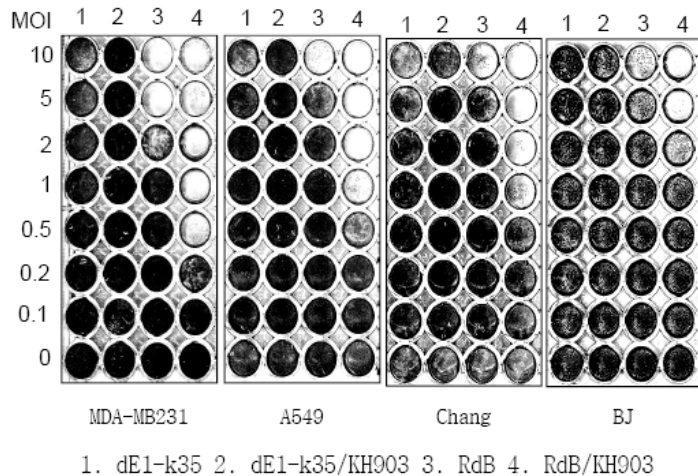


**Figure 6.** Inhibition of vessel sprouting by dE1-k35/KH903. Replication-incompetent adenovirus encoding KH903 inhibits VEGF-induced vessel sprouting *ex vivo*. The assay scored from 0(least positive) to 5(most positive).

### 3. VEGF 와 특이적으로 결합하는 KH903 을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 세포 살상능 검증

VEGF 발현 억제로 인한 신생 혈관 형성능의 감소는 종양의 성장을 억제할 수 있기 때문에 KH903 의 항암 효과를 확인해 보고자 KH903 를 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 RdB/KH903 와 대조군 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 RdB 를 각각 제작하였다. KH903 의 발현으로 아데노바이러스의 복제가 저해될 수 있는지를 확인하기 위하여, 몇 종류의 암 세포주 및 정상 세포주들을 dE1-k35, dE1-k35/KH903, RdB 또는 RdB/KH903 아데노바이러스로 감염시키고 바이러스의 복제에 따른 세포 사멸 정도를 CPE assay 로 관찰하였

다. 음성 대조군인 dE1-k35 복제 불능 아데노바이러스로 감염된 세포들에서는 아데노바이러스가 복제되지 않기 때문에 세포 살상 효과가 나타나지 않았으나, 복제 가능 아데노바이러스들인 RdB 또는 RdB/KH903 로 감염된 경우에는 바이러스 양이 증가함에 따라 세포 살상 효과도 증가되었다. 실험에 이용된 모든 세포주에서 KH903 을 발현하는 아데노바이러스인 RdB/KH903 의 세포살상능이 대조군 바이러스인 RdB 에 비해 뛰어난 것을 관찰할 수 있었다.

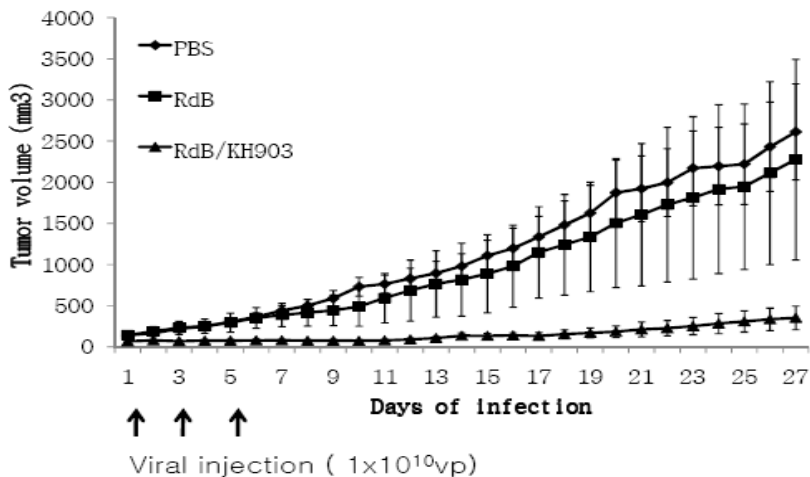


**Figure 7.** Cytopathic effects of RdB/KH903 *in vitro*. Cells were infected with dE1-k35, dE1-k35/KH903, RdB, or RdB/KH903 at the indicated MOI. Replication-incompetent adenovirus, dE1-k35 served as negative control. At 4-10 days after infection, cells remaining on the plates were fixed and stained with crystal violet.

#### 4. VEGF 와 특이적으로 결합하는 KH903 을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 생체 내 항종양 효과 검증

VEGF 발현을 억제하는 KH903 을 발현하는 아데노바이러스의 생체

내 항종양 효과를 검증하기 위하여, 인체 폐암 세포주인 H460 세포를 누드 생쥐의 복부 피하에 주사하고, 형성된 종양의 용적이 약 80~100 mm<sup>3</sup> 정도 되었을 때 1 X 10<sup>10</sup> vp 의 RdB, RdB/KH903 아데노바이러스를 음성 대조군인 PBS 와 함께 이틀 간격으로 3 번 종양 내에 투여한 후 종양의 성장을 관찰하였다(Fig. 8). 음성 대조군인 PBS 를 투여 받은 누드 생쥐의 경우, 바이러스 투여 후 23일경에 이미 종양의 용적이 약 2170.238 ± 455.1216 mm<sup>3</sup> 으로 급격하게 성장하였으나, KH903 을 발현하는 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 RdB/KH903 을 투여한 경우에는 종양의 성장이 크게 지연됨을 확인하였다. 즉, RdB, RdB/KH903 아데노바이러스를 투여 받은 생쥐의 경우 1181.391 ± 985.9131 mm<sup>3</sup>, 252.67 ± 103.8464 mm<sup>3</sup>로, KH903 의 신생 혈관 형성 억제로 인한 항종양 효과와 종양 선택적 살상 아데노바이러스의 뚜렷한 항종양 효과를 관찰 할 수 있었다.

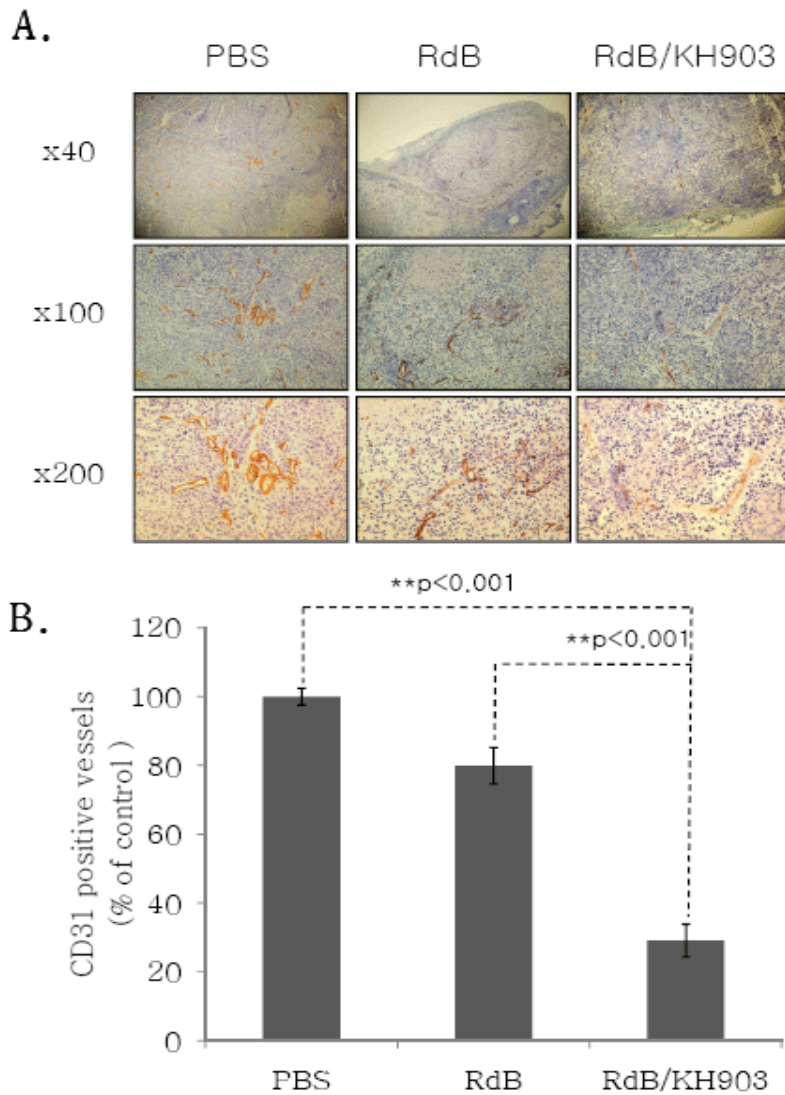


**Figure 8.** Anti tumor effect of adenovirus expressing KH903. Tumors were established by subcutaneous implantation of H460 1 x 10<sup>7</sup> cells and allowed to grow to 80~120 mm<sup>3</sup>. Nude mice with established tumors

were randomized into three treatment groups of five animals each. Each group received intratumoral injection of adenovirus( $1 \times 10^{10}$  vp of adenovirus in  $30 \mu\ell$  of PBS) on day 1, 3, and 5. Tumor growth monitored everyday by measuring the short length (w) and long lenth (L) of the tumor. Tumor volume was estimated on the basis of the following fomula ; Tumor volume( $\text{mm}^3$ ) :  $0.523 \times Lw^2$

#### **5. VEGF 발현을 억제하는 KH903 을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노 바이러스의 투여에 따른 종양 내 혈관 분포 관찰**

인체 폐암 세포주인 H460 을 누드 생쥐의 복부 피하에 주사한 후 종양 이 형성되면 RdB 와 RdB/KH903 아데노바이러스를 PBS 를 음성 대조군으 로 하여  $1 \times 10^{10}$  vp 로 이틀 간격으로 3 회 종양 내 주사하였다. 마지막 투여 후 하루 뒤에 종양을 적출하여 혈관 내피 세포 특이적 항원인 CD31 을 조직 면역 염색법을 통해 관찰하였다. 그 결과, 음성대조군인 PBS 군에 비해 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 RdB를 처리한 실험 군에서는 종양 내 혈관수가 21% 감소하였음을 확인하였고 RdB/KH903를 투여한 경우에는 혈관수가 71% 억제된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 9).



**Figure 9.** Histological assessment of angiogenesis in the H460 tumor tissue treated with RdB/KH903. (A) Microvessels were stained anti-PECAM antibody (CD31). Representative CD31 stained tissues were photographed. (B) Quantification of vessel numbers in tumor tissues. The data are presented as mean ( $n = 3$ )  $\pm$  SE.

#### IV. 고찰

신생혈관 형성은 기존에 존재하는 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 과정으로써 배 발생과, 기관의 형성 및 조직의 재생에 중요한 역할을 한다. 또한 신생혈관 형성은 초기의 종양이 성장하기 위한 필수 조건이며, 종양의 부피가 커짐에 따라 종양 세포나 침윤된 대식세포가 여러 가지 혈관형성인자를 생성하여 종양 내 미세혈관을 증식시킨다. 이렇게 증식된 혈관은 종양 세포에 영양을 공급하고 여러 가지 성장인자를 분비하여 종양을 성장시킨다. 신생혈관 형성에 참여하는 여러 성장인자 중에서 혈관 내피 세포 성장인자 (VEGF)가 종양의 성장과 전이에 중요하게 관여하는 것으로 알려져 있다. VEGF 는 두 개의 tyrosine receptor VEGFR2 (KDR)과 결합하여 직접 혈관 내피 세포의 분열을 촉진시켜 강력한 혈관신생인자로 작용하여, 미세혈관의 투과도를 증가시켜 혈장단백이 주변 조직으로 배출되어 세포 외 기질을 변화시켜 혈관생성을 용이하게 한다. 그렇기 때문에 암의 성장을 막기 위해서는 혈관 신생인자인 VEGF 의 억제가 필수적이다. 최근 30년간 항암치료의 표적은 종양 내 혈관 형성을 억제함으로써 종양의 성장을 억제하는 연구가 활발하게 진행되어 왔다. 그러나 현재까지 이러한 혈관생성 억제제는 주로 단일 치료제로 이용되기 보다는 병합 치료에 많이 이용되고 있으며 고비용과 반복 투여로 인한 독성을 일으킬 수 있다는 단점이 있다. 본 연구에서는 이러한 한계점을 극복하고자 수용성 VEGF 특이적 decoy receptor 로 작용하는 KH903 을 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 발현시킴으로써 효과적으로 VEGF 를 억제시킴과 동시에 종양 선택적 살상 아데노바이러스를 사용함으로써 총체적인 항종양효과를 향상시키고자 하였다.

KH903 은 VEGFR1 과 VEGFR2 의 VEGF 결합 도메인을 결합시켜



제작한 VEGF 특이적 수용성 decoy receptor 로서 종양 세포에서 분비되는 VEGF 를 효과적으로 억제할 수 있다. 즉, VEGF 와 VEGFR 의 결합 상호작용에 직접적으로 관여하는 VEGFR1,2 의 주요 도메인을 이용하여 제작한 KH903 은 VEGFR 대신에 종양세포에서 분비되는 VEGF 와 결합하여 receptor-ligand 반응을 차단시킴으로써 신생혈관 형성 과정을 억제시킬 수 있다<sup>29,30</sup>.

초기에 제작된 VEGF trap 은 VEGF 와 결합하는 주요 부위인 VEGFR1 의 두 번째 도메인과 VEGFR2 의 세 번째 도메인이 human IgG Fc region 에 퓨전된 형태이다<sup>11</sup>. 본 연구에서는, VEGF-A 뿐만 아니라 VEGF-B, VEGF-C 그리고 placenta growth factor(PlGF)와도 결합할 수 있기 때문에 VEGF 와의 결합능이 기존의 VEGF trap 에 비하여 2 배 가량 향상된 KH903 을 이용하였다. KH903 이 VEGF-A 를 비롯하여 모든 종류의 VEGF family 와 우수한 결합능을 보이는 까닭은 기존의 VEGF trap 구조에 VEGF 와 수용체의 강한 결합이 유지되도록 관여 하는 VEGFR2 의 4 번째 도메인이 추가가 되었기 때문이다. 또한, 이 도메인은 KH903 이 3 차 구조를 안정적으로 이룰 수 있게 해줄 뿐 아니라 dimer 형태를 이루는 효율을 높여 주어 KH903 은 기존 VEGF trap 보다 연장된 half-life 를 갖는 이점을 지닐 수 있게 되었다<sup>29</sup>. 이러한 장점들을 가진 KH903 의 신생 혈관 형성 억제 효과를 관찰하기 위하여 E1 부위에 reporter gene 으로  $\beta$ -galactosidase 가 삽입되어 있고 E3 부위 유전자가 소실된 아데노바이러스의 E3 부위에 KH903 을 삽입하여 복제 불능 아데노바이러스 dE1-k35/KH903 을 제작하였다. 혈관 형성이 왕성한 A549 와 H460 을 비롯하여 여러 폐암 세포주들에 다양한 MOI 로 감염시키고 VEGF 발현 양을 비교 검증한 결과, 실험에 이용한 모든 세포주에서 KH903 이 VEGF 의 발현을 억제하는 효과가 강력하게 나타남을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). 이렇게 KH903 에 의

해 종양세포에서 VEGF 의 발현이 효과적으로 억제됨을 관찰한 후 감소한 VEGF 양이 실제 혈관 내피세포의 이동, 증식 그리고 혈관 형성 및 확장과 같은 신생 혈관 형성의 일련에 과정에 어떠한 영향을 미치는지 *in vitro* 와 *ex vivo* 상에서 관찰하였다.

먼저, 혈관 내피 세포인 HUVEC 에 KH903 을 발현하는 복제 불능 바이러스 dE1-k35/KH903 을 감염시켰을 때 VEGF 발현양의 감소에 의해 혈관 내피 세포 생존율이 감소함을 확인하였다. 이어서 KH903 을 발현하는 복제 불능 바이러스와 대조군 바이러스를 각각 감염시킨 세포 그리고 uninfected cell 의 배양액을 이용하여 혈관 내피 세포의 이동능력을 관찰할 수 있는 Migration assay 를 진행하였다. 성장인자가 충분히 있는 대조군 바이러스와 uninfected cell 의 배양액을 이용하였을 때에는 HUVEC 의 이동이 활발히 일어남을 관찰할 수 있었으나 KH903 을 발현하는 바이러스를 처리한 세포로부터 얻은 배양액을 이용하였을 경우에는 VEGF 감소에 의해 HUVEC 의 이동이 상당히 감소한 것을 관찰할 수 있었다. 혈관 형성능과 혈관의 sprouting 또한 억제됨을 Tube formation assay 과 aorta sprouting assay 를 통하여 검증하였다. 이러한 KH903 을 통한 신생 혈관 형성 억제는 항암 효과를 기대할 수 있으므로 종양 선택적 살상 아데노바이러스에 탑재하여 증대된 항종양 효과를 검증하고자 본 연구실에서 개발한 E1A 의 Rb 결합 부위가 변형되고 E1B 부위가 제거된 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 RdB 에 KH903 을 삽입한 RdB-KH903 아데노바이러스를 제작하여 H460 xenograft model 에서 우수한 항종양 효과를 확인하였다. 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 RdB-KH903 은 E1A 유전자 발현에 따른 VEGF 발현 억제뿐 아니라 효율적이고 지속적인 유전자 전달로 인해 KH903 에 의한 VEGF 발현 억제도 함께 유도하여, 대조군인 RdB 아데노바이러스에 비하여 생체 내 항종양 효과를 현저하게 증진시켰다.

종양 조직 내 혈관 분포를 관찰한 결과에서도 RdB/KH903 의 효과를 다시 한 번 검증할 수 있었다. 종양 조직에서 PBS 군에 비하여 종양 선택적 살상 아데노바이러스를 처리한 경우 혈관의 수가 감소하여 종양 선택적 살상 아데노바이러스만으로도 신생 혈관 형성을 억제 할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한, KH903 으로 인하여 더욱 확연한 신생 혈관 형성 억제 효과를 입증함으로써 KH903 이 효과적으로 VEGF 를 억제하였음을 알 수 있었다.

결론적으로, 본 연구에서 제작한 KH903 을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 RdB-KH903 은 VEGF 특이적 수용성 decoy receptor 인 KH903 을 통하여 얻을 수 있는 종양 내 신생 혈관 형성의 차단과 함께 아데노바이러스의 종양 특이적 살상능을 동시에 유도하여 한층 더 증대된 항종양 효과가 유도되는 것으로 사료된다.

## V. 결론

VEGFR1 과 VEGFR2 의 VEGF 결합 도메인을 사람 IgG Fc region 에 결합시켜 제작한 KH903 은 효과적으로 종양세포가 분비하는 VEGF 를 억제할 수 있었다. 본 연구에 이용된 KH903 을 발현하는 종양 선택적 살상 아데노바이러스인 RdB-KH903 는 종양 선택적 아데노바이러스의 복제에 의한 종양 선택적 살상능과 더불어 E1A 발현과 KH903 에 의해 유도된 VEGF 의 억제로 인해 상승된 항종양효과를 보여 암 치료에 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

## 참고문헌

1. George DY, Samuel D, Nicolas.WG, John SR, Stanley J, Wiegand et al., Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature 2000; 407: 242-8.
2. Gabriele B, Rolf B, Gerald M, Thinneu HV, Takeshi I, Kazuhiko T, et al., Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. Nat Cell Bio 2000; 2: 737-44.
3. Toren F, and Stephen EE, Gene therapy for vascular disease. FASEB J 1995; 9: 843-51.
4. Janice AN, Eliza V, Dian F, Christian S, Lawrence FB, Michael JD et al., Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. J. Exp. Med 2002; 196: 1497-1506
5. Megan EB, Steven AS, Mark GA, Molecular control of lymphangiogenesis. Bioessays 2002; 24: 1030-40
6. Joyce EO, Dmitry IG, George DS, Ekaterina K, Kelly SP, Sorean N et al., VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. Blood 2003; 101: 4878-86
7. Joyce EO, Carbone DP, VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. Immunol. Res 2001; 23: 263-72
8. Lee ME, Daniel JH, VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity, Nat Rev Cancer 2008; 8: 579-91
9. Kerbel RS, Tumor Angiogenesis, N Engl J Med 2008; 358: 2039-49
10. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G, Isolation of a Tumor factor responsible for angiogenesis. J. Exp. Med 1971;

133-275

11. Shin-Ae L, Seok-Reyol C, Jin-Seok J, Jong-Hun L, Myung-Hwan R, Sang Ock K, Expression of VEGF, EGFR, and IL-6 in Gastric Adenomas and Adenocarcinomas by Endoscopic Submucosal Dissection, *Dig Dis Sci* 2009; 12:
12. Vosseler S, Mirancea N, Bohlen P, Mueller MM, Fusenig NE, Angiogenesis inhibition by vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade reduces stromal matrix metalloproteinase expression, normalizes stromal tissue, and reverts epithelial tumor phenotype in surface heterotransplants. *Cancer Res* 2005; 65: 1294-305.
13. Jocelyn H, Sam D, Nick P, Susan DC, Lillian H, Michelle R et al., VEGF-Trap : a VEGF blocker with potent antitumor effects, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 11393-8
14. S. Percy Ivy, Jeannette Y. Wick and Bennett MK, An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2009; 6: 569-579
15. Ke Xie, Rui-Zhen B, Yang W, Quan L, Kang L, Yu-Quan W, Anti-tumor effects of a human VEGFR-2-based DNA vaccine in mouse models, *Genetic Vaccines and Therapy* 2009; 7:
16. Puja, Debashish B, Shaija S, Lee ME, Targeting Tumor Angiogenesis. *Seminars in Oncology* 2009; 36: S12-S19
17. Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis* 2004; 7: 335-45.
18. Jocelyn H, Sam D, Nick P, Susan DC, Lillian H, Michelle R *et al.*,

VEGF-Trap : a VEGF blocker with potent antitumor effects. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 11393-8

19. Fukasawa M, Korc M., Vascular endothelial growth factor-trap suppresses tumorigenicity of multiple pancreatic cancer cell lines. Clin Cancer Res 2004; 10: 3327-32.

20. Jianzhong H, Jason SF, Anna S, Angela K, Akiko Y, Kimberly WM *et al.*, Regression of established tumors and metastases by potent vascular endothelial growth factor blockade. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 7785-90

21. Hu L, Hofmann J, Holash J, Yancopoulos GD, Sood AK, Jaffe RB. Vascular endothelial growth factor trap combined with paclitaxel strikingly inhibits tumor and ascites, prolonging survival in a human ovarian cancer model. Clin Cancer Res 2005; 11: 6966-71

22. Reily GJ, Miller VA, Vascular Endothelial Growth Factor Trap in Non-Small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res 2007; 13: 4623-4627

23. Juan F, Candelaria GM, Ramon A, Polly SYL, Timothy JM, Paraskevi M, *et al.*, A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. Oncogene 2000; 19: 2-12.

24. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff DD, Kirn DH : 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.

25. Lee H, Kim J, Lee B, Chang JW, Ahn J, Park JO *et al.*, Oncolytic potential of E1B 55 kDa-deleted YKL-1 recombinant adenovirus:

correlation with p53 functional status. *Int J Cancer* 2000; 88: 454-463.

26. 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: 725-736.

27. Sauthoff H, Heitner S, Rom WN, Hay JG : Deletion of the adenoviral E1b-19kD gene enhances tumor cell killing of a replicating adenoviral vector. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 379-388.

28. Zhou Z, Zhou RR, Guan H, Bucaba CD, Klenerman ES., E1A gene inhibits angiogenesis in Ewing's sarcoma animal model. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 1313-1319

29. Akeo S, Mikito I, Hideharu A, Sachiko Y, Kenya S, Masabumi S., Mapping of the Sites Involved in Ligand Association and Dissociation at the Extracellular Domain of the Kinase Insert Domain-containing Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 1998; 273: 31283-31288

30. Florence T.H. Wu, Marianne O. Stefanini, Feilim Mac Gabhann, Aleksander S. Popel, A compartment model of VEGF distribution in humans in the presence of soluble VEGF receptor-1 acting as a ligand trap. *Plos One* 2009; 4: 1-36



## Abstract

Anti-tumor effect of oncolytic adenovirus  
expressing VEGF trap

Hye won Shin

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

(Directed by Professor Chae-Ok Yun)

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing vessels, is tightly regulated by balancing between inducer and suppressor of angiogenesis in normal tissues. Tumor vessels have features that the formation of vessels are leaky and irregular because unregulated angiogenesis is generated to supply oxygen and nutrient for growth and invasion during tumor growth. Therefore, VEGF which plays a pivotal role in angiogenesis can be an attractive target for anti-cancer therapy.

VEGF Trap is a soluble VEGF decoy receptor that is comprised of the second immunoglobulin-like domain of human VEGFR1 and the third immunoglobulin-like domain of human VEGFR2 linked to the constant region (Fc) of human IgG1. KH903 has an additional

extracellular domain 4 of VEGFR2 (KDRd4) which can increase binding affinity with VEGF. To express this potent VEGF blockade continuously, we used a vector based on delivery system such as recombinant viral vectors. Replication-incompetent adenovirus expressing KH903, dE1-k35/KH903, induced anti-angiogenesis through down regulation of VEGF. It was verified using hVEGF ELISA, HUVEC proliferation assay, migration assay, tube formation assay and rat aorta sprouting assay. In addition, RdB-KH903 showed enhanced anti-tumor effect in comparison to its congnate control oncolytic adenovirus, RdB, in H460 tumor xenograft model. Furthermore, vessel density in tumor tissue treated with RdB/KH903 was greatly reduced compared to that in tumor treated with RdB.

In conclusion, these data showed that the newly generated adenovirus expressing KH903 could be effective cancer therapeutic oncolytic adenovirus to exert its down-regulation of VEGF level secreted from cancer cells.

---

Key Words : VEGF, VEGF trap, KH903, angiogenesis, adenovirus