# 연세대학교 대학원 의과학과 윤 아 름

아데노바이러스 E1B 유전자 변이체와 항암제의 병용투여에 의한 암세포 살상능의 변화 아데노바이러스 E1B 유전자 변이체와 항암제의 병용투여에 의한 암세포 살상능의 변화

> 연세대학교 대학원 의과학과 윤 아 름

# 아데노바이러스 E1B 유전자 변이체와 항암제의 병용투여에 의한 암세포 살상능의 변화

# 지도교수 윤 채 옥 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2003년 12월 일

연세대학교 대학원 의 과 학 과

윤 아 름

# 윤아름의 석사 학위논문을 인준함

심사위원	인
심사위원	ગ
심사위원	၇၂

# 연세대학교 대학원

2003년 12월 일

그림 및 표 차례
국문요약1
I. 서론 ·······3
Ⅱ. 재료 및 방법8
1. 대상 세포주 및 세포배양8
2. 재조합 아데노바이러스 Ad-ΔE1B55와
Ad-∆E1B19/55의 생산8
3. Cytopathic effect 분석을 통한 종양 세포 살상능
비교9
4. MTT assay를 통한 종양 세포 살상능 비교11
5. 바이러스 생산량의 비교
6. PI staining을 통한 세포고사 관찰
7. TUNEL assay를 통한 세포고사 관찰 12
8.생체내 항종양 효과 검증
Ⅲ. 결과14
1. 종양 특이적 살상 아데노바이러스인

Ad-∆E1B19/55와 항암제의 병용투여에 의한

- 3.항암제에 의한 종양 특이적 살상

- 6. 종양 특이적 살상 아데노바이러스와 paclitaxel의
  - 병용투여에 의한 생체내 항종양 효과 검증 …… 34

- Abstract ······45

# 그림 차례

Fig. 1. Schematic representation of two E1B matant
adenoviruses
Fig. 2. PCR product analysis of E1B mutant
adenoviruses
Fig. 3. Comfirmation of $IC_{50}$ of replicating
adenoviruses and chmotherapeutic agent in vitro
Fig. 4. Oncolytic assays of replicating adenoviruses
and chmotherapeutic agent in vitro
Fig. 5. Efficient cancer cell killing effect of
combination therapy21
Fig. 6. Comparative growth curve of Ad- $\Delta$ E1B55,
Ad- $\Delta$ E1B19/55 virus-only treatment and Ad- $\Delta$ E1B55,
Ad-AE1B19/55 with chemotherapeutic
agents treatment
Fig. 7. Efficient Apoptosis of combination therapy

Fig. 8. In vitro TUNEL assay
Fig. 9. Anti-tumor effect of combination therapy
against C33A tumors in male athmic nude mice $\cdot\cdot$

### 감사의 글

먼저 실험실 생활과 논문 전반에 걸쳐 지도해 주시고 항상 세심한 관심과 사랑을 보여주시는 윤채옥 선생님 께 깊은 감사를 드립니다. 바쁘신 중에도 논문에 대한 관심과 조언을 아끼지 않으셨던 김주항 선생님, 논문의 심사를 위해 수고해 주신 김호근 선생님께 진심으로 감사드립니다.

지난 2년간 같이 생활을 하면서 힘든일과 기쁜일을 함께했던 재성선배님, 은희언니, 대봉선배님, 영숙언니, 동현오빠, 경주언니, 유가 지영언니, 구라이언 태영이, 평환오빠, 정희, 태영이와 은아언니 그리고 손주혁 선 생님과 황경화 선생님 모두 감사합니다.

누구 하나 빼놓았다간 서운해 할까봐 섣불리 이름을 쓸 수 없는, 우정과 웃음으로 언제나 내 삶을 풍성하게 만들어 주는 사랑하는 친구들에게 고마움을 표합니다.

변치 않는 신뢰를 보내주시고 항상 기도로 후원해주 시는 할머니와 부모님, 언니보다 더 어른스러워 항상 의지하는 사랑하는 동생 승혜와 효원, 예원에게 감사함 과 함께 사랑의 마음을 전합니다.

마지막으로 나의 인생을 주관하시고 아름답게 인도해 주시는 하나님의 신실하심을 찬양합니다.

저자 씀

## 아데노바이러스 E1B 유전자 변이체와 항암제의 병용투여에 의한 암세포 살상능의 변화

암에 대한 유전자 치료연구의 최근 경향은 한 가지 특정 유전자를 이용한 치료법의 개발보다는 여러 치료 유전자를 동시에 이용하는 방 안, 암세포를 선택적으로 죽일 수 있는 종양 특이 증식 살상 아데노 바이러스의 개발, 방사선 또는 항암제 등 기존의 치료방법과 병합 치 료하는 방안 등이 활발히 연구되고 있다. 최근의 연구에서는 아데노 바이러스 초기 유전자인 E1B 55kDa 유전자가 결손된 아데노바이러스 dl1520 아데노바이러스와 taxol의 병용투여가 암세포 살상에 있어 상승 작용을 유도함을 보고한 바 있다. 하지만, 항암제와의 병합치료 (combination therapy)에 이용되는 dl1520(ONYX-015)을 포함한 대부 분의 아데노바이러스에는 세포고사 억제 기능을 가진 E1B19kDa 유전 자가 원상태로 그대로 보존되어 있어 여러 항암제에 의해 유도되는 세포고사를 억제하여 항암 효과를 저해시킬 수 있다. 그러므로 E1B 19kDa 단백질의 기능이 선택적으로 소실된 암세포 특이적 증식 가능 아데노바이러스를 항암제와 함께 병용 치료한다면, 아데노바이러스의 증식에 따른 세포괴사 뿐 아니라 아데노바이러스 또는 항암제에 의해 유도되는 세포고사를 함께 유도할 수 있어, 항종양 효과를 개선시킬 수 있을 것이다. 이러한 배경 하에 본 연구에서는, 아데노바이러스와 는 다른 기작으로 작용하여 세포를 살상하는 항암제인 paclitaxel, adriamycin, 5-FU 그리고 cisplatin등을 E1B 55kDa 유전자가 결손된

종양 특이적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔE1B55 또는 E1B 55kDa 과 E1B 19kDa 유전자가 모두 결손된 종양 특이적 살상 아데노바이러스 인 Ad-ΔE1B19/55와 함께 병용 투여함으로써 암세포 살상능의 변화 및 병용치료에 따른 상승효과를 규명하고자 하였다. 이에, 본 연구에 서는 복제 가능 아데노바이러스의 세포 살상능을 비교 검증할 수 있 는 CPE assav와 MTT assav를 통하여 Ad-ΔE1B55에 비해 Ad-Δ E1B19/55에 의한 세포 살상능이 우수함을 확인할 수 있었다. 또한, 아데노바이러스만을 단독 처리했을 때에 비해 아데노바이러스와 항암 제를 병용 투여한 경우의 암세포 살상능이 월등히 우수함을 확인할 수 있었다. 특히 E1B 19kDa 유전자가 결손된 Ad-AE1B19/55 아데노 바이러스와 항암제를 병용 투여한 경우의 암세포 살상능이 E1B 19kDa 유전자가 존재하는 Ad-∆E1B55와 항암제를 병용 투여한 경우 보다 월등히 증가하였다. 이러한 Ad-ΔE1B19/55와 항암제의 병용투여 에 의한 암세포 살상능의 상승작용은 생체내 항종양 실험에서도 확인 되었다. 결론적으로, 이들 결과들은 E1B 19kDa의 기능이 선택적으로 소실된 암세포 특이적 살상 아데노바이러스와 항암제의 병용 치료를 통하여 아데노바이러스의 증식에 따른 세포괴사 뿐 아니라 아데노바 이러스 또는 항암제에 의해 유도되는 세포고사를 함께 유도할 수 있 어, 항종양 효과를 더욱 개선시킬 수 있음을 의미하다. 이는 결과적으 로 증식 가능 아데노바이러스와 항암제의 병용치료법의 임상적 유용 성을 확립하여 암유전자 치료에 진일보된 방안으로 제시될 수 있을 것으로 기대된다.

핵심되는 말: 아데노바이러스, 항암제, 병용투여, 택솔, Ad-ΔE1B55, Ad-ΔE1B19/55

# 아데노바이러스 E1B 유전자 변이체와 항암제의 병용투여에 의한 암세포 살상능의 변화

<지도교수 윤채옥>

연세대학교 대학원 의과학과

#### 윤아름

#### I. 서론

유전자 치료란 치료유전자를 인체세포에 전달하여 질병을 치 료하거나 예방하는 방법으로써 기초 생명과학의 발전으로 가능하게 된 새로운 치료영역이다. 대부분의 현대 의학이 단순히 질병의 증상 만을 치료하는 것임에 반해 유전자 치료는 질병의 원인이 되는 유전 적 결함을 보정하거나 세포에 새로운 유전적 기능을 부여하는 등의 방법으로 질병의 원인을 치료한다는 점에서 지금까지의 치료법과는 근본적으로 다른 성격들을 가지고 있다. 유전자 치료에 사용하는 대 표적인 유전자 전달 수단으로는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아 데노 부속 바이러스(AAV), 그리고 리포솜 등을 이용한 방법들이 있 다. 이들 중 아데노바이러스는 높은 역가로 생산이 가능하고 쉽게 농 축할 수 있으며 생체내 전달이 용이하다는 점이 보고 되면서, 최근 재조합 아데노바이러스를 유전자 치료에 이용하는 빈도수가 급격히 증가하고 있다<sup>1</sup>. 더욱이 암 치료에는 치료용 유전자의 발현이 2-3주 정도로도 충분하며, 바이러스에 의해 유도되는 세포성 면역반응이 크 게 문제시되지 않거나 오히려 이점이 될 수도 있기 때문에 아데노바 이러스를 암유전자 치료용 유전자 전달체로 개발하려는 노력이 활발 히 이루어지고 있다<sup>2</sup>.

아데노바이러스를 이용한 초기의 유전자치료는 아데노바이러스의 E1 유전자를 결손시킨 복제 불가능한 바이러스에 치료용 유전자를 바이러 스 복제에 필수적이지 않은 E3 유전자의 자리에 치환시킨 제 1세대 바 이러스를 이용하였다. 이들을 유전자 전달체로 이용하는 경우는 일차 감염세포 또는 극히 일부의 주변세포들에만 항암효과를 유발할 수 있 어. 임상적인 실용성 면에서 많은 제약이 있다<sup>3</sup>. 이를 극복할 수 있는 한 방안으로 McCormick 그룹은 아데노바이러스의 초기 유전자인 E1B 55kDa이 부분적으로 결손된 dl1520을 개발하였으며, 이 바이러스는 암 세포에서만 선택적으로 증식하고 살상할 수 있음을 보고한바 있다 4. 이를 토대로 두경부암 환자들을 대상으로 dl1520의 제 3상 임상시험 이 현재 진행 중이다<sup>5</sup>. 그리고 본 연구팀에서도 E1B 55kDa 유전자가 결손된 아데노바이러스 YKL-1을 개발하여 이들이 p53 유전자의 변 형이 일어난 암세포에서만 증식하여 암세포를 선택적으로 살상할 수 있음을 보고하였다<sup>6</sup>. 그러나 이러한 E1B 55kDa 유전자가 결손된 아데 노바이러스들의 종양세포에 대한 살상능은 야생형 아데노바이러스의 경우보다 현격히 낮아 임상에 효과적으로 적용하기 위해서는 이들의

세포 살상능이 개선되어야한다.

증식 가능 아데노바이러스에 의한 암세포 살상효과를 향상시키기 위 하여, cytosine deaminase(CD)와 thimidine kinase(TK)과 같은 자살 유전자나 종양세포 살상을 유도하는 cytokine인 tumor necrosis factor(TNF)를 증식 가능 아데노바이러스에 탑재하여 유전자치료에 이용하는 방안이 시도되고 있다<sup>10</sup>. 또한 암세포 특이적 증식 가능 아 데노바이러스인 E1B 55kDa 유전자가 결손된 아데노바이러스의 암세 포 살상능을 증가시키기 위하여 시도된 cisplatin 또는 5-FU 등의 항 암제를 병용 투여한 초기 임상실험에서 긍정적인 결과들이 보고 되었 으며, 이러한 통합 치료기법은 현재 제 3상 임상실험으로 진행 중이 다<sup>11</sup>. 최근의 세포사 기전에 관한 연구들에서 밝혀진 바와 같이, 여러 항암제에 의한 세포사멸은 주로 세포고사에 의해 이루어지며 이들에 의한 항암효과는 암세포의 세포고사 기능이 정상적일 때 더욱 효과적 이다. 이러한 배경 하에, 세포고사를 유도할 수 있는 bax 유전자를 발 현하는 아데노바이러스와 taxol을 함께 투여하여 항암효과를 개선하 려는 시도도 최근에 진행되고 있다<sup>12</sup>.

아데노바이러스의 초기 발현 유전자인 E1B 19kDa은 강력한 세포고 사 억제제로써 Bcl-2와 염기서열 및 그 기능이 유사하며<sup>7</sup>, E1A 및 p53에 의해 유도되어지는 세포고사를 억제한다<sup>8</sup>. 또한, 세포 성장인자 의 결핍, 방사선 치료, 또는 항암제의 치료에 의해 유도되는 세포고사 를 억제하는데도 E1B 19kDa과 Bcl-2가 기능적으로 같은 역할을 한 다고 보고 된 바 있다<sup>9</sup>. 실제로 김재성 등은 E1B 19kDa 유전자의 기 능이 소실된 증식 가능 아데노바이러스는 E1B 19kDa 유전자를 함유 하고 있는 증식 가능 아데노바이러스 보다 세포고사를 더욱 촉진시켜 결과적으로 바이러스 증식에 의한 세포 살상능을 증가시킬 수 있음을 보고하였다. 이와 같은 여러 결과들을 종합해 볼 때, 세포고사를 유도 함으로서 세포살상을 촉진시키는 여러 항암 치료제와 종양 특이적 복 제 가능 아데노바이러스에 의한 세포 살상능에 있어서, 강력한 세포 고사 억제제 역할을 하는 E1B 19kDa 단백질은 이들에 의한 암세포 살상효과를 오히려 감소시켜 항암효과를 저해할 수 있다.

항암치료에 가장 많이 쓰이고 있는 항암제로는 pacliaxel, cisplatin, adriamycin, 그리고 5-FU등이 있다. 그 중 paclitaxel은 튜블린 단위 체의 중합작용을 유도하여 마이크로튜블을 안정화시킴으로써 유사분 열 과정에서 cell cycle을 정지시켜 종양세포의 세포고사를 유도한다<sup>22</sup>. 한편, 대표적 알킬화제(alkylating agent)로 분류되는 cisplatin은 DNA 에서 수소이온을 알킬기(R-CH)로 대치시켜 세포가 사용할 수 없는 분자로 만들어 신진대사에 장애를 일으킴으로써 세포의 증식을 막고 세포고사를 유도한다. adriamycin은 topoisomerase와 DNA가 공유결 합을 통한 복합체를 형성하게하고 DNA의 intercalator로 작용하여 세 포사를 유도하며, 5-FU는 세포핵에서 DNA가 형성되는 S시기에 작용 하여 nucleotide의 생성이나 그 기반이 되는 purine 또는 pyrimidine 형성을 방해함으로써 DNA합성을 저지하는 항대사제(antimetabolite) 로 작용한다.

최근의 연구에서 dl1520 아데노바이러스와 paclitaxel의 병용투여로 암

세포 살상능을 상승적으로 향상시킬 수 있음이 보고되었다<sup>14</sup>. 하지만, 항암제와의 병합치료에 이용되는 dl1520을 포함한 대부분의 아데노바 이러스는 E1B 19kDa 유전자가 원상태로 그대로 보존되어 있어 E1B 19kDa 단백질이 여러 항암제에 의해 유도되는 세포고사를 억제하여 항암 효과를 저해시킬 수 있다. 그러므로 E1B 19kDa 단백질의 기능 이 선택적으로 결손된 암세포 특이적 증식 가능 아데노바이러스를 항 암제와 함께 병용투여 한다면, 아데노바이러스의 증식에 따른 세포괴 사 뿐 아니라 아데노바이러스 또는 항암제에 의해 유도되는 세포고사 를 함께 유도할 수 있어, 항종양 효과를 개선시킬 수 있을 것이다. 하 지만, 국내외적으로 아직 E1B 55kDa 유전자만 결손된 종양 특이적 살상 아데노바이러스와 E1B 55kDa 유전자와 E1B 19kDa 유전자가 함께 결손된 종양 특이적 살상 아데노바이러스를 여러 항암제와 병용 투여하였을 때의 항암 효과를 비교 검증한 연구는 이루어지지 않았 다. 따라서 본 연구에서는, 아데노바이러스와는 세포살상 기작이 다른 여러 종류의 항암제들을 E1B 55kDa 유전자만 결손된 아데노바이러스 또는 E1B 55kDa 과 E1B 19kDa 유전자가 모두 결손된 증식 가능 아 데노바이러스와 함께 병용투여함으로써 암세포 살상능의 변화 및 병 용투여에 따른 항암효과의 개선여부를 규명하고자 본 연구를 계획하 였다. 이는 향후 증식 가능 아데노바이러스와 항암제의 병용투여시 임상적 유용성 여부에 대한 지침을 제시할 수 있을 것이며 나아가 암 유전자 치료를 진일보된 방안으로 확립하는 데에도 일조를 할 수 있 을 것으로 사료된다.

#### Ⅱ. 재료 및 방법

#### 1. 대상 세포주 및 세포배양

실험에 사용된 세포주들은 자궁경부암 세포주(C33A), 폐암 세포주 (A549), 간암 세포주(Hep3B)와 293 세포주 등이며, 모두 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA)에서 구 입하였다. 모든 세포주들은 10%의 우태아혈청(GIBCOBRL, Life Tchnologies, Rockville, MD)과 항생제 penicillin/streptomycin(GIBCOBRL)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium(GIBCOBRL)으로 5% CO<sub>2</sub>의 존재 하에 37℃ 항온 배 양기에서 배양하였다.

#### 2. 재조합 아데노바이러스 Ad-ΔE1B55와 Ad-ΔE1B19/55의 생산

아데노바이러스의 E1B 19kDa와 E1B 55kDa 유전자가 모두 결손된 아데노바이러스 E1 셔틀벡터를 제작하기 위해, 먼저 E1A 유전자만을 포함시킬 수 있는 primer set를 제작해 아데노바이러스 E1A 셔틀벡 터인 pXC1(Micrpbix, Ontario, Canada)을 주형 DNA로 하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였으며, 생성된 PCR 산물 을 BamHI으로 절단한 후 pCA14의BgIII 부위에 cloning 시켜 pΔ E1B19/55 E1 셔틀벡터를 제작하였다. 그리고 E1B 55kDa 유전자가 결손된 E1 셔틀벡터를 제작하였다. 그리고 E1B 55kDa 유전자가 결손된 E1 셔틀벡터를 제작하기 위해, 아데노바이러스 E1 부위 중 E1B 55kDa 유전자를 선택적으로 결손시키기 위해 E1A와 E1B 19kDa를 포함시킬 수 있는 primer를 제작해 pXC1(Micrpbix, Ontario, Canada)을 주형 DNA로 하여 PCR을 수행하여 바이러스의 유전자 염 기서열상 343에서 2270을 포함하는 PCR 산물을 획득하였다. PCR로 얻어진 1.9kb 생성물을 BamHI으로 절단한 후 E1이 완전히 소실된 pCA14의 BgIII 부위에 cloning 시켜 pΔE1B55 E1 셔틀벡터를 제작 하 였다. 제작된 각각의 E1 셔틀벡터는 XmnI 제한효소를 처리한 뒤 CalI으로 처리한 E1 및 E3 유전자가 결손된 아데노바이러스 벡터인 pTG-CMV와 함께 대장균 BJ5183에 형질전환시켜 유전자 상동 재조 합을 유도하였다. 상동 재조합된 플라즈미드 DNA를 제한효소 PacI으 로 처리하여 선형화 시킨 뒤 293 세포주에 lipofectamine(GIBCOBRL) 을 이용하여 형질전환하여 Ad-ΔE1B55와 Ad-ΔE1B19/55 아데노바이 러스를 생산하였다. 생성되어진 각각의 아데노바이러스들은 293 세포 주에서 증식시켜 limiting dilution 또는 plaque assay로 바이러스의 역가를 결정하였다. 동물실험을 위해서는 CsCl gradient로 농축하여 바이러스를 순수 분리하였다.

#### 3. Cytopathic effect 분석을 통한 종양 세포 살상능 비교

암세포 특이적 살상 아데노바이러스와 항암제의 암세포에 대한 각각 의 세포 살상능과 병용투여에 의한 암세포 살상능 변화를 비교하기 위하여, 인체 자궁암 세포주인 C33A와 인체 폐암 세포주인 A549, 그 리고 인체 간암세포주인 Hep3B등을 24-well plate에 분주하고 24시간 후 Ad-ΔE1B19/55 또는 Ad-ΔE1B55(YKL-1) 바이러스를 각각 0.5, 1, 0.05 multiplicity of infection(MOI)으로 감염시켰다. 바이러스 감염 후 24시간에 각각의 세포들을 paclitaxel(100, 50, 10, 5, 1 nM), adriamycin(1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01μg), 5-FU(10, 5, 1, 0.5, 0.1 μg), 또는 cisplatin(10, 5, 1, 0.5, 0.1 μM)으로 처리하였다. 가장 낮은 농도의 항



Fig. 1. Schematic representation of two E1B mutant adenoviruses, Ad- $\Delta$ E1B55 and Ad- $\Delta$ E1B19/55. Ad- $\Delta$ E1B55 contains the normal E1A and E1B 19kDa, but is E1B 55kDa deleted; Ad- $\Delta$ E1B19/55 contains the normal E1A, but is E1B 19kDa and E1B 55kDa deleted.

암제가 처리된 well에서 세포살상이 확인되면 잔존한 세포들을 1% crystal violet(50% methanol)으로 염색하고 고정하여 아데노바이러스 와 항암제를 각각 사용하였을 때와 이들을 병용투여 하였을 때 유도 하는 암세포 살상능을 비교하였다,

#### 4. MTT assay를 통한 종양 세포 살상능 비교

암세포 특이적 살상 아데노바이러스와 항암제 처리 후 시간에 따른 각각의 암세포 살상능과 병용투여에 의한 세포 살상능의 변화를 비교 하기 위하여, 인체 자궁암 세포주인 C33A와 인체 폐암 세포주인 A549. 그리고 인체 간암세포주인 Hep3B등을 24-well plate에 분주하 고 24시간 후 Ad-ΔE1B19/55 또는 Ad-ΔE1B55 아데노바이러스를 각 각 0.5. 1, 0.05 MOI로 감염시켰다. 바이러스 감염 후 24시간에 각각 의 세포들을 paclitaxel(5 nM), adriamycin(0.01 µg), 5-FU(0.1 µg), 또 는 cisplatin(1 µM)으로 처리하였다. 항암제 처리 후 0, 3, 5, 7일째에 MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2vl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 2mg/ml) 용액 200 雌씩을 plate well에 첨가하여 4시간동안 37℃ 항 온기에서 반응시킨 후 MTT에 의해 살아있는 세포에서 포마젠 결정 이 형성되면 1 ml의 DMSO(dimethyl sulphoxide)를 첨가하고 37℃에 방치한 후 microplate reader(Molecular Devices 저 10분간 Corporation, Sunnyvale, CA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정 하여 세포의 상대적 생존율을 측정하였다. 세포의 생존률은 측정된 흡광도 값을 이용하여 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

#### 5. 바이러스 생산량의 비교

각각의 항암제가 아데노바이러스의 복제와 생산에 미치는 영향을 알 아보기 위해서, C33A 세포주에 Ad-ΔE1B19/55 또는 Ad-ΔE1B55 아데 노바이러스를 0.5 MOI로 감염시키고 24시간 후 paclitaxel(5 nM), adriamycin(0.01 μg), 5-FU(0.1 μg), 또는 cisplatin(1 μM)을 각각 첨가 하였다. 항암제 처리 후 24, 48, 72 시간에 바이러스를 수득하고, 수득 된 각각의 아데노바이러스 총생산량을 limiting titration법<sup>15-16</sup>으로 측 정하였다.

#### 6. PI staining을 통한 세포고사 관찰

암세포 특이적 아데노바이러스와 항암제의 암세포에 대한 각각의 세 포고사 유도능력과 병용투여에 따른 세포 살상능 변화를 비교하기 위 하여 C33A 세포주, A549 세포주, Hep3B 세포주(1 × 10<sup>6</sup> cell)를 25T culture flask에 분주하고 24시간 후 Ad-ΔE1B19/55 또는 Ad-Δ E1B55(YKL-1)바이러스를 0.5MOI, 1MOI, 0.05MOI로 감염 시켰다. 바이러스 감염 24시간 뒤 paclitaxel(5 nM), adriamycin(0.05 µg), 5-FU(0.1 µg), cisplatin(1 µM)을 투여하였다. 바이러스 처리 2일 뒤에 세포를 회수하여 PBS로 세척하고 70%Ethanol로 4℃에서 24시간 이 상 고정시켰다. 고정과정이 끝나면 PI(50µg/µℓ)와 RNase 혼합된 용액 을 넣고 15분간 반응시킨 뒤 FACS 분석을 시행하였다.

#### 7. TUNEL assay를 통한 세포고사 관찰

암세포 특이적 살상 아데노바이러스와 항암제의 암세포에 대한 각각

의 세포고사 유도능력과 병용투여에 따른 세포 살상능 변화를 비교하 기 위하여, C33A(2 × 10<sup>4</sup> cell), A549(5 × 10<sup>4</sup> cell), 또는 Hep3B(4 × 10<sup>5</sup> cell) 세포주를 chamber slide에 분주하고 Ad-ΔE1B19/55 또는 Ad-ΔE1B55 아데노바이러스를 0.5, 1, 0.05 MOI로 각각 감염시켰다. 바이러스 감염 후 24시간에 paclitaxel(5 nM), adriamycin(0.01 µg), 5-FU(0.1 µg), 또는 cisplatin(1 µM)을 처리하고 24시간 후에 배지를 제거하고 ApopTaq Kit(Intergen, Purchasw, NY)을 이용해 TUNEL assay를 시행하였다. 발색여부를 확인하기 위해 peroxidase와 결합된 avidin을 사용하여 diaminobenzidine(DAKO, Carpintaeria, CA)과 반 응시킨 후 세포들이 갈색으로 변하는 것이 육안으로 확인되면 0.5% methyl green으로 10분간 염색하고 cover glass로 고정시켜 현미경으 로 관찰하였다.

#### 8. 생체내 항종양 효과 검증

생후 6 ~ 8 주 경과된 누드마우스의 복벽에 1×10<sup>7</sup>개의 자궁암 세포 주 C33A를 피하 주사한 뒤, 종양의 크기가 약 60 - 80 mm<sup>3</sup> 정도 성 장하였을 때 5 × 10<sup>6</sup> plaque-forming unit(PFU)의 아데노바이러스와 음성 대조군인 PBS를 종양내에 직접 주사하였다. 바이러스 투여 후 4 일 동안 4 mg/kg의 paclitaxel을 매일 복강내 투여하고 종양의 성장 을 관찰하였다. 종양의 크기는 caliper를 이용하여 종양의 장축과 단축 을 측정한 후 다음과 같은 공식으로 산출하였다. *Tumor size(mm<sup>3</sup>)=* (단축 *mm*)<sup>2</sup> × 장축 *mm* × 0.523. 종양의 용적비교는 Mann-Whitney test를 이용하였다.

#### Ⅲ. 결과

## 1. 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔE1B55와 Ad-Δ E1B19/55의 생산

E1B 55kDa와 E1B 19kDa 유전자가 서로 다르게 조합된 2개의 종양 특이적 살상 아데노바이러스인 Ad-ΔE1B55와 Ad-ΔE1B19/55를 제작 한 후, 이들 아데노바이러스들의 유전체내 E1 유전자의 구성을 확인 하기 위해 E1B 55kDa와 E1B 19kDa 유전자들에 대한 특정 primer set을 각각 이용하여 PCR을 수행하였다. 인체 자궁암 세포주인 C33A 를 Ad-ΔE1B55와 Ad-ΔE1B19/55와 음성 대조군으로 Ad-ΔE1을 각각 10 MOI로 감염시킨 후 세포로부터 바이러스 유전체를 회수해 그것을 주형 DNA로 하여 각각의 특이 primer로 PCR하여 증폭된 PCR 산물 의 존재 여부와 크기를 분석하였다(Fig. 2A). Ad-ΔE1아데노바이러스 로 감염된 세포에서는, Ad-ΔE1 아데노바이러스가 E1 유전자가 결손 되어 있는 복제 불능 아데노바이러스이므로 어떠한 PCR 산물도 생성 되지 않았으며, Ad-AE1B19/55의 경우는 E1B 55kDa와 E1B 19kDa 유전자가 소실되어 있어 E1A 특이산물(479bp)만이 생성되었고, Ad-Δ E1B55의 경우는 E1A(479bp)와 E1B 19kDa(429bp) 유전자에 대한 PCR 산물이 생성되었지만 E1B 55kDa 유전자의 소실로 E1B 55kDa 에 대한 특정 primer set에 의해서는 PCR 산물이 생성되지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 2B).



Fig. 2. A: The E1 region-specific primer sets corresponding to E1A, E1B 19kDa, and E1B 55kDa are shown below the diagram of E1 region of adenovirus genome, and each expected size of PCR products is 479, 429 and 338 bp, respectively. B: PCR product analysis of E1B mutant adenoviruses. Left marker(GIBCO, Gaithers-burg, MD)is 1-kb DNA ladder. The presence of each PCR product verified the presence of the gene deletion.

2. 종양 특이적 살상 아뎨노바이러스 Ad-AE1B55, Ad-AE1B19/55 와 항암제의 병용투여에 의한 암세포 살상능 상승효과 비교 검증 종양 특이적 살상 아뎨노바이러스와 항암제의 병용투여에 의한 종양 살상능과 상승효과를 검증하기 위한 예비실험으로, 실험에 이용할 아 데노바이러스와 항암제의 적정 투여량을 산출하였다. 살아있는 세포 의 생존률을 측정할 수 있는 MTT 분석을 통해 Ad-AE1B55와 Ad-A E1B19/55 아뎨노바이러스의 적정 투여 역가는 C33A, A549, 그리고 Hep3B 세포주의 경우 각각 0.5, 1, 그리고 0.2 MOI로 정했고, paclitaxel의 적정 투여량은 세포의 생존률이 80%정도 되는 지점인 5 nM로 정했다. 같은 방법으로 adriamycin, 5-FU, cisplatin의 적정농도 를 각각 0.05μg, 0.1μg, 1 μM로 산출하여 투여하였다(Fig. 3).

Ad-ΔE1B55 또는 Ad-ΔE1B19/55와 항암제의 병용투여에 의한 종양 살상능 상승효과를 검증하기 위하여, C33A, A549, 그리고 Hep3B 세 포주들을 대상으로 Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1B55 바이러스를 각각 0.5, 0.2, 1MOI로 감염시켰다. 바이러스 감염 후 24시간에 각각의 세포들 을 paclitaxel(100, 50, 10, 5, 1 nM), adriamycin(1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 µg), 5-FU(10, 5, 1, 0.5, 0.1 µg), 또는 cisplatin(10, 5, 1, 0.5, 0.1 µM) 으로 처리하여 세포의 사멸 정도를 비교 분석하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 실험에 사용된 C33A, A539, Hep3B 세포주 모두에서 항 암제만을 처리한 경우 또는 항암제와 재조합 아데노바이러스Ad-Δ E1B55, Ad-ΔE1B19/55를 병용투여 한 경우 모두 투여된 항암제의 양 이 증가함에 따라 세포 살상 효과가 증가되는 것이 관찰되었으며,



Fig. 3. Confirmation of IC<sub>50</sub> of chmotherapeutic agents *in vitro*. Monolayer of cancer cells was treated with paclitaxel at the range of 1– 1000 nM (A), adriamycin at the range of 0.1–100  $\mu$ g (B), 5–FU at the range of 0.1–100  $\mu$ g (C). or cisplatin at the range of 0.1–10  $\mu$ M (D). MTT assay was performed to tally viable cells, and results are the mean of triplicate experiments.



Fig. 4. The *in vitro* oncolvtic assays of replicating adenoviruses, agents, or combination of adenovirus and chemotherapeutic chemotherapeutic agents. A: monolaver of cancer cells was treated with paclitaxel (lane 1), paclitaxel and Ad- $\Delta$ E1B55 (lane 2), or paclitaxel and Ad-AE1B19/55 (lane 3) at the range of 1- 100 nM of paclitaxel and at an MOI of 0.5 (C33A), 1 (A549), and 0.2 (Hep3B) of adenoviruses. **B**: monolayer of cancer cells was treated wit adriamycin (lane 1), adriamycin and Ad-AE1B55 (lane 2), or adriamycin and Ad- $\Delta$ E1B19/55 (lane 3) at the range of 0.01-1  $\mu$ g of adriamycin and an MOI of 0. 5(C33A), 1 (A549) and 0.2 (Hep3B) of adenoviruses. C: monolayer of cancer cells was treated with 5-FU (lane 1), 5-FU and Ad- $\Delta$ E1B55 (lane 2), or 5-FU and Ad- $\Delta$ E1B19/55 (lane 3) at the range of 0.1-10 µg and an MOI of (C33A), 1 (A549) and 0.2 (Hep3B) of adenoviruses. **D**: 0.5 monolayer of cancer cells was treated with cisplatin (lane 1), cisplatin and Ad- $\Delta$ E1B55 (lane 2), or cisplatin and Ad- $\Delta$ E1B19/55 (lane 3) at the range of 0.1–10  $\mu g$  and an MOI of 0.5 (C33A), 1 (A549), and 0.2 (Hep3B). At the moment in which cells treated with any treatment at the lowest concentration exhibited complete cell lysis, cells on the plate were fixed and stained with crystal violet. Representative results are shown.

Ad-ΔE1B55 또는 Ad-ΔE1B19/55를 항암제와 병용투여 한 경우에 항 암제 또는 아데노바이러스를 단독으로 투여한 경우보다 높은 종양 살 상능이 유도되었다. 특히, Ad-ΔE1B55와 항암제를 병용투여한 경우보 다 Ad-ΔE1B19/55와 항암제를 병용투여한 경우가 더 높은 종양 살상 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 종양 특이적 아데노바이러스와 항암제의 병용투여에 의한 암 세포 살상능 상승효과를 보다 정량화하기 위해서, 바이러스와 항암제 를 처리한 후, 살아있는 세포의 생존률을 측정할 수 있는 MTT 분석 을 시행하였다. C33A, A539, 또는 Hep3B 세포주를 각각 0.5, 1, 0.2 MOI의 아데노바이러스로 각각 감염 시키고 24시간 후 각각의 세포들 읔 paclitaxel(5 nM), adriamvcin(0.05 µg), 5-FU(0.1µg), 또는 cisplatin(1 µM)으로 처리한 뒤 3, 5, 7일 후에 살아남은 세포의 생존 률을 측정하였다. 그 결과, Fig 5에서 보는 바와 같이 본 실험에 이용 된 모든 세포주들에서 Ad-∆E1B55 또는 Ad-∆E1B19/55와 paclitaxel 의 병용투여에 의한 암세포 살상능이 각각을 따로 처리 했을 때에 비 해 약 40%정도 증가되어 세포살상능이 상승적으로 향상되었음을 확 인하였다. 또한 항암제와의 병용투여 시 Ad-AE1B19/55 아데노바이러 스가 Ad-ΔE1B55 아데노바이러스에 비해 증가된 세포 살상능을 보였 고, 이러한 결과들은 항암제와 종양 특이적 살상 아데노바이러스를 병용투여 한 경우가 항암제와 아데노바이러스를 각각 단독 처리했을 때에 비해 상승적인 암세포 살상 효과를 유도할 수 있음을 의미하며, 또한 E1B 19kDa 단백질의 기능이 소실된 종양 특이적 살상 아데노바 이러스의 세포 살상능이 E1B 19kDa 단백질의 기능을 그대로 유지하



Fig. 5. Efficient cancer cell killing effect of combination therapy. A: monolayer of cancer cells was treated with PBS  $(\spadesuit)$ , paclitatel (×), Ad- $\Delta$ E1B55 ( $\blacksquare$ ), Ad- $\Delta$ E1B19/55 ( $\blacktriangle$ ), Ad- $\Delta$ E1B55 plus paclitaxel (\*), or Ad- $\Delta$ E1B19/55 plus paclitaxel ( $\bigcirc$ ) at 5 nM of paclitaxel and 0.5 (C33A), 1 (A549), and 0.2 (Hep3B) MOI of adenoviruses. B: monolayer of cancer cells was treated with PBS ( $\blacklozenge$ ), adriamycin (×), Ad- $\Delta$ E1B55 ( $\blacksquare$ ), Ad- $\Delta$ E1B19/55 ( $\blacktriangle$ ), Ad- $\Delta$ E1B55 plus adriamycin (\*), or Ad- $\Delta$ E1B19/55 plus adriamycin ( $\bigcirc$ ) at 5 nM of adriamycin and 0.5 (C33A), 1 (A549), and 0.2 (Hep3B) MOI of adenoviruses. C: monolayer of cancer cells was treated with PBS ( $\blacklozenge$ ), 5-FU (×), Ad- $\Delta$ E1B55 ( $\blacksquare$ ), Ad- $\Delta$ E1B19/55 ( $\blacktriangle$ ), Ad- $\Delta$ E1B55 plus 5-FU (\*), or Ad- $\Delta$ E1B19/55 plus 5-FU( $\bigcirc$ ) at 5 nM of 5-FU and 0.5 (C33A), 1 (A549), and 0.2 (Hep3B) MOI of adenoviruses. D: monolayer of cancer cells was treated with PBS  $(\blacklozenge)$ , cisplatin (×), Ad- $\Delta$ E1B55 ( $\blacksquare$ ), Ad- $\Delta$ E1B19/55 ( $\blacktriangle$ ), Ad- $\Delta$ E1B55 plus cisplatin (\*), or Ad- $\Delta$ E1B19/55 plus cisplatin ( $\bigcirc$ ) at 5 nM of cisplatin and 0.5 (C33A), 1 (A549), and 0.2 (Hep3B) MOI of adenoviruses. MTT assay was performed to tally viable cells, and results are the mean of triplicate experiments.

는 아데노바이러스에 비해 증가되어 보다 높은 세포 살상효과를 유도 할 수 있음을 의미한다.

3. 항암제에 의한 종양 특이적 살상 아데노바이러스의 증식능 비교 C33A 세포주에 Ad-AE1B19/55 또는 Ad-AE1B55를 0.5 MOI로 각각 감염시키고 24시간 후 항암제를 첨가한 뒤 24, 48, 72시간에 증식된 아데노바이러스를 수득하였다. 배지로 방출된 아데노바이러스와 세포 내에 잔존하는 아데노바이러스의 총생산량을 산출하기 위하여, 감염 된 세포와 배지를 모두 수득하여 limiting titration assav<sup>15-16</sup>를 시행 하여 바이러스의 총생산량을 측정하였다. Ad-ΔE1B19/55 또는 Ad-Δ E1B55 아데노바이러스만을 0.5 MOI로 처리하여 같은 방법으로 실험 을 진행한 대조군과 비교해본 결과, Ad-ΔE1B55에 의해 감염된 293 세포주에서의 바이러스 총생산량은 24시간, 48시간, 그리고 72시간 후 에 각각 1.42 x 10<sup>6</sup>, 1.00 x 10<sup>7</sup>, 그리고 3.99 x 10<sup>8</sup> PFU였으며, Ad-A E1B19/55와 paclitaxel을 병용투여한 경우의 바이러스 총생산량은 각 각 2.00 x 10<sup>6</sup>, 2.24 x 10<sup>7</sup>, 그리고 7.96 x 10<sup>8</sup> PFU였다. Ad-A E1B19/55에 의해 감염된 293 세포주에서의 바이러스 총생산량은 24 시간, 48시간, 그리고 72시간 후에 각각 2.00 x 10<sup>6</sup>, 7.96 x 10<sup>7</sup>, 그리 고 1.78 x 10<sup>10</sup> PFU였으며. Ad-ΔE1B19/55와 paclitaxel을 병용투여한 경우의 바이러스 총생산량은 각각 2.51 x 10<sup>6</sup>, 3.17 x 10<sup>9</sup>, 그리고 7.10 x 10<sup>10</sup> PFU로 Ad-∆E1B19/55 아데노바이러스와 paclitaxel을 병용투 여 하였을 때의 바이러스 총생산량이 Ad-ΔE1B19/55와 paclitaxel을 병용투여한 경우에 비하여 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 6). 아데 노바이러스만 처리하였을 경우와 아데노바이러스를 paclitaxel과 함께

병용투여 하였을 경우의 바이러스 총생산량은 paclitaxel을 처리하고 난 뒤 72시간을 기준으로 보았을 때, Ad-ΔE1B55의 경우 약 2배가량, 그리고 Ad-ΔE1B19/55의 경우에는 약 4배가량 증가하였다. 이러한 결 과는 paclitaxel 투여에 의한 아데노바이러스 감염률의 증가와 이에 따른 바이러스의 세포살상능이 향상되었음을 의미한다.

이와 대조적으로, adriamycin, 5-FU, 또는 cisplatin을 아데노바이러 스와 함께 병용투여 한 경우의 바이러스 총생산량을 비교해보면, 아 데노바이러스만 감염시킨 경우에 비해서 항암제와 아데노바이러스를 병용투여 한 경우의 바이러스 총생산량이 비슷하거나 오히려 감소하 는 것을 확인할 수 있었다. 먼저 adriamycin의 경우, Ad-ΔE1B55 또 는 Ad-AE1B19/55에 의해 감염된 C33A 세포주에서의 바이러스 총생 산량은 바이러스 처리 후 72시간에 1.19 x 10<sup>7</sup>과 2.55 x 10<sup>11</sup> PFU였으 며, Ad-ΔE1B55 또는 Ad-ΔE1B19/55를 adriamycin과 함께 병용투여 경우의 바이러스 총생산량은 72시간 뒤 8.82 x 10<sup>6</sup>과 6.94 x 10<sup>9</sup> PFU 로 아데노바이러스와 adriamvcin를 병용투여 하였을 때 오히려 아데 노바이러스의 생산량이 감소하였다(Fig. 6B), 5-FU의 경우에도 Ad-A E1B55 또는 Ad-ΔE1B19/55에 의해 감염된 C33A 세포주에서의 바이 러스 총생산량은 바이러스 처리 후 72시간 뒤 1.19 x 10<sup>7</sup>과 2.55 x 10<sup>11</sup> PFU였으며, Ad-ΔE1B55 또는 Ad-ΔE1B19/55를 5-FU와 함께 병 용투여한 경우의 바이러스 총생산량은 72시간 뒤 8.82 x 10<sup>6</sup>과 6.49 x 10<sup>8</sup> PFU로 5-FU를 투여함으로써 오히려 바이러스 생산량을 감소시 켰음을 알 수 있었다(Fig. 6C). 또한, cisplatin의 경우에도 adriamycin 과 5-FU의 경우와 마찬가지로 항암제 투여에 의하여 아데노바이러스



**Fig. 6.** Comparative total virus production of adenovirus alone and adenovirus with chemotherapetic agent. C33A cells were infected with Ad-ΔE1B55 or Ad-ΔE1B19/55 adenovirus at an MOI of 0.5 for 24 hr, and subsequently cells were treated with paclitaxel at 5 nM (A), adriamycin at 0.05  $\mu$ g (B), 5-FU at 1  $\mu$ g (C), or cisplatin at 0. 1  $\mu$ M (D) for 24 hr. Each sample was then determined by limiting titration assay in 293 cell. Data shown are representative results of two independent experiments.

의 생산능이 감소하였다(Fig. 6D)

# 4. PI staining을 통한 종양 특이적 살상 아데노바이러스와 항암제의 병용투여에 의한 세포내 고사 관찰

본 연구에서 사용된 Ad-ΔE1B19/55과 Ad-ΔE1B55 아데노바이러스가 실제적으로 E1B 19kDa 단백질에 의존적으로 세포고사를 억제하는지, 그리고 항암제와 바이러스를 병용투여 하였을 경우 상승적인 세포 살 상능을 유도하는지를 확인하기위해, 세포고사가 일어나면 DNA가 무 작위적으로 절편화되어 나타나는 subGn의 증가율을 PI 염색을 통한 유세포 분석을 시행해 관찰하였다. 두 종류의 종양 특이적 살상 아데 노바이러스를 C33A와 A549, 그리고 Hep3B에 각각 0.5, 1, 그리고 0.05 MOI로 처리하고 24시간 뒤 paclitaxel(5 nM), adriamvcin(0.05 μg), 5-FU(0.1 μg), 또는 cisplatin(1 μM)을 처리하였다. 항암제 처리 후 2일 만에 세포를 회수하고 subG<sub>1</sub> population의 증가를 관찰 하였 다. 세포고사 유도화학물질인 camptothecin(CPT)을 1 µM의 농도로 처리한 양성대조군의 경우, 실험에 이용된 모든 세포주들에서 세포고 사를 유도하여 subG<sub>1</sub> population이 크게 증가하는 것을 확인하였다. C33A 세포주에 paclitaxel만을 처리한 경우, 전체세포 중 subG<sub>1</sub> population의 비율이 음성대조군과 비교하여 거의 변화되지 않은 반 면, Ad-∆E1B55 또는 Ad-∆E1B19/55 아데노바이러스에 의해 감염된 경우는 약 12%, 55%의 세포들이 subG1 시기에 속해있었다. 또한 paclitaxel과 Ad-∆E1B55 또는 Ad-∆E1B19/55 아데노바이러스를 병용 투여 한 경우의 subG1 population이 각각 약 20%와 60%로 아데노바 이러스와 항암제를 단독으로 처리한 경우보다 높은 비율로 세포사를 유도하였음을 알 수 있었다. 또한, adriamycin, 5-FU, 그리고 ciaplatin도 아데노바이러스와 함께 병용투여 한 경우에 유도되는 subG population의 비율이 아데노바이러스와 항암제를 각각 단독 처 리한 경우보다 현격히 증가되었다. adriamycin을 처리한 경우, Ad-A E1B55 또는 Ad-ΔE1B19/55에 의해 감염된 C33A 세포주의 경우에 각 각 약 11%와 54%의 세포들이 subGn 시기에 속해있었으며, adriamycin을 함께 병용투여한 경우에는 각각 12%와 55%의 세포들 이 subG<sub>1</sub> 시기에 속해있었다. 5-FU를 처리한 경우, Ad-ΔE1B55 또는 Ad-△E1B19/55을 단독으로 처리한 경우에 각각 약 4%와 16%의 세포 들이 subG1 시기에 속해있었으며, 5-FU을 함께 병용투여한 경우에는 각각 6%와 17.5%의 세포들이 subG 시기에 속해있었다. cisplatin을 처리한 경우, Ad-ΔE1B55 또는 Ad-ΔE1B19/55을 단독으로 처리한 경 우에 각각 약 12%와 55%의 세포들이 subG1 시기에 속해있었으며, cisplatin을 함께 병용투여한 경우에는 각각 약 14% 와 62%의 세포들 이 subG1 시기에 속해있었다. 이러한 결과들은 A549와 Hep3B의 경우 에서도 비슷한 양상으로 나타났다.

이상과 같은 결과들을 통하여, 종양 특이적 살상 아데노바이러스를 항암제와 병용투여한 경우 E1B 19kDa 단백질을 발현하지 않는 Ad-Δ E1B19/55에 의해 감염 되었을 때가 E1B 19kDa 단백질을 발현하는 대조군 아데노바이러스인 Ad-ΔE1B55에 의해 감염되었을 때 보다 세 포고사가 현격히 높은 빈도로 진행되었음을 알 수 있었고, 또한 아데 노바이러스만을 단독 처리한 경우에 비해 항암제와 아데노바이러스를 함께 병용투여한 경우에 상승적으로 세포사의 빈도를 향상시켜 보다 빠르게 암세포를 살상할 수 있음을 알 수 있었다.





**Fig. 7.** Efficient induction of apoptosis of combination therapy (I). A: At 48 hr after cells were treated without (–) or with 1 μM of CPT (+), chemotherapeutic agent A; paclitaxel at 5 nM, B; adriamycin at 0.05 μg, C; 5–Fu at 0.1 μg, D; cisplatin at 1 μM), Ad-ΔE1B55, Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1B55 plus chemotherapeutic agent, or Ad-ΔE1B55 plus chemotherapeutic agent at an MOI of 0.5 (C33A), 1 (A549), and 0.05 (Hep3B) of adenoviruses, apoptotic cells were detected by PI staining.

## 5. TUNEL assay를 통한 종양 특이적 살상 아데노바이러스와 항 암제의 병용투여에 의한 세포고사 관찰

암세포 특이적 살상 아데노바이러스 또는 항암제를 단독투여 한 경 우의 세포고사 유도 능력과 이들을 함께 병용투여 하였을 때 세포고 사 진행이 상승적으로 증가하는지를 검증하기 위하여, 초기 세포내고 사의 특징인 DNA 절편화를 확인할 수 있는 TUNEL assay를 시행하 였다. Fig. 8에서 볼 수 있듯이, 양성 대조군으로 사용한 CPT-11을 처리한 모든 세포주의 경우에 거의 대부분의 세포들이 진한 갈색으로 염색되어 세포고사가 활발히 진행되고 있음을 확인하였다. 인체 자궁 암 세포주인 C33A의 경우, Ad-AE1B55을 단독 처리하였을 때 약 10%미만의 세포들이 진한 갈색으로 염색된 반면 Ad-ΔE1B19/55의 경 우는 약 30%의 세포들이 진한 갈색으로 염색되어 E1B 19kDa 단백질 을 발현하지 않는 Ad-ΔE1B19/55에 의해 감염되었을 때 보다 높은 빈 도로 세포고사가 진행되었음을 확인할 수 있었다. Ad-AE1B19/55 또 는 Ad-ΔE1B55를 paclitaxel과 함께 병용투여한 경우에는 각각 약 70~80%와 60%정도의 세포들이 진한갈색으로 염색되어, 서로 다른 진 행경로를 통해 세포사멸을 유도할 수 있는 종양 특이적 살상 아데노 바이러스와 항암제를 함께 병용투여 하여 세포 살상효과를 상승적으 로 증가시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한, E1B 19kDa 단백질을 발현하지 않는 Ad-AE1B19/55을 paclitaxel과 함께 병용투여 한 경우, Ad-ΔE1B55의 경우에 비해서 그 상승효과가 크게 증가한다는 것을 알 수 있었다. 이상과 같은 결과들은 A539 또는 Hep3B 세포주에서도 나타났으며, adriamycin, 5-FU, 또는 ciaplatin과 같은 다른 항암제를 투여한 경우에도 모두 비슷한 경향으로 나타났다.



с		(–)	(+)	5-FU	Ad-∆E1B55	∆55+ 5-FU	Ad−∆E1B 19/55	∆B+ 5-FU
C33A	X 100							9. 19. 19.
	X 400							
A549	X 100					1		
	X 400							1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
Hep3B	X 100							
	X 400							
-		<i>/</i>	<i>.</i>			∆55+	Ad-AE1B	ΔB+ Oisustatia
D C33A	X 100	(-)	(+)	Cisplatin	Ad-∆E1B55	Δ55+ Cisplatin	Ad-ΔE1B 19/55	ΔB+ Cisplatin
D C33A	X 100 X 400	(-)	(+)	Cisplatin	Ad-ΔE1B55	A55+ Cisplatin	Ad- <u>A</u> E1B 19/55	ΔB+ Cisplatin
D C33A A549	X 100 X 400 X 100	(-)	(+) 	Cisplatin	Ad-ΔE1B55	A55+ Cisplatin	Ad-AE1B 19/55	ΔB+ Cisplatin
D C33A A549	X 100 X 400 X 100 X 400	(-)	(+)	Cisplatin	Ad-ΔE1B55	A55+ Cisplatin	Ad-AE1B 19/55	ΔB+ Cisplatin
D C33A A549 Hep3B	X 100 X 400 X 100 X 400 X 100	(-)	(+)	Cisplatin	Ad-ΔE1B55	A55+ Cisplatin	Ad-AE1B 19/55	ΔB+ Cisplatin

**Fig. 8.** Efficient induction of apoptosis of combination therapy (II). A: At 48 hr after cells were treated without (-) or with 1 μM of CPT (+), chemotherapeutic agent A; paclitaxel at 5 nM, B; adriamycin at 0.05 μg, C; 5–Fu at 0.1 μg, D; cisplatin at 1 μM), Ad-ΔE1B55, Ad-ΔE1B19/55, Ad-ΔE1B55 plus chemotherapeutic agent, or Ad-ΔE1B55 plus chemotherapeutic agent at an MOI of 0.5 (C33A), 1 (A549), and 0.05 (Hep3B) of adenoviruses, apoptotic cells were detected by TUNEL assay.

## 6. 종양 특이적 살상 아데노바이러스와 paclitaxel의 병용투여에 의한 생체내 항종양 효과 검증

종양 특이적 살상 아데노바이러스와 Taxol을 병용투여 하였을 때 이 들을 단독으로 투여한 경우에 비해 생체내 항종양 효과가 개선되는지 를 알아보기 위해서, C33A 세포주를 누드 마우스에 접종하여 형성된 종양에 Ad-ΔE1B55 또는 Ad-ΔE1B19/55를 각각 5 x 10<sup>7</sup> PFU)/50 ul 로 종양 내에 투여한 후 paclitaxel을 4 mg/kg로 매일 3번 복강내 투 여하였다(Fig. 9). 음성 대조군인 PBS를 종양내 투여 하고 생체식염 수를 3번 복장내투여한 누드 생쥐의 경우에는 종양의 크기가 PBS 투 여 후 35일에 1000 ± 325.21m 로 빠르게 성장하였으나. Ad-AE1B55. Ad-∆E1B19/55, 또는 paclitaxel을 단독 또는 이들을 함께 병용투여한 경우에는 음성 대조군에 비해 종양의 성장이 현저히 억제되었다. 즉, Ad-ΔE1B55, Ad-ΔE1B19/55, 또는 paclitaxel을 단독투여 받은 생쥐의 경우, 항암제 투여 후 35일에 종양의 크기가 각각 265.58 ± 144.53mm 이고, 179.74 ± 59.00mm, 552.99 ± 67.96mm로 paclitaxel과 종양 특이적 삼상 아데노바이러스의 뚜렷하 항종양효과를 관찰할 수 있었다(P < 0.05). 또한 Ad-ΔE1B55과 paclitaxel 또는 Ad-ΔE1B19/55과 paclitaxel 을 병용투여 한 경우, 투여 후 35일에 종양의 크기는 50.48 ± 24.09mm 와 34.25 ± 9.83mm'로 아데노바이러스와 항암제를 단독투여 한 경우에 비해 종양의 성장이 더욱 억제 되어 상승적인 항종양 효과를 확인할 수 있었다.



Fig. 9. C33A xenografts in nude mice were treated with intratumoral injection of taxol alone, Ad- $\Delta$ E1B19/55 alone, Ad- $\Delta$ E1B55 alone, Ad- $\Delta$ E1B19/55 plus taxol, or Ad- $\Delta$ E1B55 plus taxol. Tumor growth was monitored on a 2- to 3-day interval. Data points represent the mean ± SE of the tumor size in each group at the indicated time points (n=6).

Ⅳ.고찰

증식 가능 아데노바이러스가 새로운 암 유전자 치료법으로 대두된 이후 현재 이를 이용한 임상시험들이 활발히 진행되고 있다. 최근에 이루어진 초기 임상시험 결과 증식 가능 아데노바이러스가 인체에 안 전하며 항종양 효과를 나타낸다는 것이 밝혀졌지만<sup>7-9</sup>, 낮은 암세포 살상능으로 고농도의 아데노바이러스를 반복적으로 투여하여야 하는 문제점이 제기되고 있다<sup>6.17</sup>. 이를 극복하기 위한 한 방안으로 종양 선 택적 살상능을 지니는 dl1520 아데노바이러스와 5-FU 또는 cisplain 을 병용투여한 결과 각각을 단독 투여한 경우에 비하여 이들을 병용 투여 하였을 때 세포 살상능이 현저히 향상되고 암조직 내의 바이러 스의 확산이 증가되었음이 보고된 바 있다<sup>5</sup>. 그러나 YKL-1 또는 dl1520와 같은 기존의 종양 특이적 살상 아데노바이러스들은 세포고 사 억제 기능을 가진 E1B 19kDa 단백질을 발현하여 여러 항암제에 의해 유도되는 세포고사를 억제할 수 있으며, 그 결과 아데노바이러 스와 항암제에 의해서 유도되어지는 세포 살상능을 감소시킬 수 있 다.

이러한 가능성을 보다 체계적으로 검증하기 위해서 본 연구에서는 E1B 55kDa 유전자만 결손된 Ad-ΔE1B55와 E1B 55kDa 유전자와 E1B 19kDa 유전자가 동시에 결손된 Ad-ΔE1B19/55를 paclitaxel, adriamycin, 5-FU, 그리고 cisplatin 등의 항암제와 함께 투여하였을 때의 세포 살상능, 세포고사 빈도 및 생체 내 항종양 효과를 비교 검 증해 보았다. 세포 살상능을 가시적으로 확인할 수 있는 CPE assay 와 세포 살상능을 정량화할 수 있는 MTT assay를 통해, E1B 19kDa 유전자가 소실된 Ad-AE1B19/55 아데노바이러스가 E1B 19kDa 유전 자가 존재하는 Ad-ΔE1B55 아데노바이러스 보다 높은 세포 살상능을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 종양 특이적 살상 아데노바 이러스와 여러 종류의 항암제를 각각 단독 처리한 경우보다 이들을 함께 처리한 경우에 보다 높은 세포 살상능이 유도될 수 있음을 확인 할 수 있었다. 항암제와 아데노바이러스를 병용투여한 경우에도, Ad-ΔE1B19/55 아데노바이러스의 경우가 Ad-ΔE1B55 아데노바이러스에 비해서 암세포 살상능의 상승효과가 더욱 현저하였다. 이는 증식 가 능 아데노바이러스에서 E1B 19kDa 유전자를 소실시킦으로서 아데노 바이러스에 의해 유도될 수 있는 세포고사의 촉진과 함께 항암제에 의한 세포고사가 억제되지 않아 결과적으로 항암효과가 증대될 수 있 음을 의미한다. 종양 특이적 살상 아데노바이러스와 항암제에 의해서 유도되어지는 세포고사를 보다 가시적으로 그리고 정량적으로 관찰하 기 위해서 진행한 PI staining과 TUNEL assav를 통해서도, Ad-∆ E1B19/55 아데노바이러스에 의해서 감염된 경우가 Ad-ΔE1B55의 경 세포고사가 월등히 증가함을 알 수 있었으며, 또한 항암 우에 비해 제와 함께 병용투여 한 경우에도 강력한 세포고사 억제제인 E1B 19kDa 단백질의 결손에 의해 세포고사가 크게 증폭됨을 확인할 수 있었다.

아데노바이러스와 paclitaxel의 병용투여에 의한 상승작용의 기전은 현재 확실히 알려지지는 않았지만 본 연구를 통해 몇 가지 가설을 제 안할 수 있다. 첫째, 바이러스 자체가 taxol의 항종양 효과를 증가시킨 다는 가설을 세울 수 있다. 아데노바이러스의 E1A 유전자의 발현은 항암제에 대한 종양세포의 감수성을 증가시킨다고 보고 되었는데<sup>21</sup>. Ad-△E1B19/55와 Ad-△E1B55는 증식 가능 아데노바이러스이므로 바 이러스의 증식에 필수적인 E1A 유전자가 그대로 보존되어 있어 항암 제에 대한 종양세포의 민감성을 증가시켜 세포고사를 유도할 수 있 다. 이러한 추론은 taxol과 아데노바이러스를 병용투여한 C33A 세포 주에서 항암제나 아데노바이러스를 각각 단독 처리한 경우보다 더 많 은 세포고사가 관찰되는 본연구의 결과와 일치한다. 둘째, taxol은 아 데노바이러스의 생산량을 증가시킬 것으로 추정된다. taxol은 DNA 복제과정에 관여하여 종양의 세포 고사를 유도하는 다른 항암제와는 달리, 튜블린 단위체의 중합작용을 유도하여 마이크로튜블을 안정화 시킴으로써 세포주기을 유사분열 과정에서 정지시킨다<sup>22</sup>. 따라서 taxol 을 병용투여 한 경우, 아데노바이러스의 복제 과정에 아무런 부정적 인 영향을 미치지 않으며 오히려 세포분열이 억제됨으로써 바이러스 생산효율이 증가되는 것으로 예상된다. 이러한 추론은 아데노바이러 스의 복제능에 미치는 항암제의 영향을 알아보기 위해 진행한 실험에 서, Ad-ΔE1B19/55 또는 Ad-ΔE1B55를 paclitaxel과 함께 처리 하였을 때의 바이러스 총생산량이 Ad-&E1B19/55 또는 Ad-&E1B55를 단독으 로 처리하였을 때에 비해서 증가한 본 실험의 결과와도 일치한다. 이 와 대조적으로, DNA 복제에 부정적인 영향을 미치는 adriamycin, 5-FU, 또는 cisplatin과 아데노바이러스를 함께 병용 처리하였을 때는 바이러스의 총생산량이 Ad-ΔE1B19/55나 Ad-ΔE1B55을 단독으로 처 리하였을 때에 비해서 유사하거나 오히려 감소함을 확인할 수 있었 다.

아데노바이러스를 생체 내에 전신투여하면 거의 대부분의 아데노바 이러스는 간에서 검출되고 이에 따라 간독성이 유발되며, 이와 같은 간독성은 투여한 바이러스의 용량에 의존적인 것으로 보고 되고 있 다. 본 연구의 결과, 증식 가능 아데노바이러스와 항암제를 병용투여 하여 일정수준 이상의 살상능력을 나타내는데 필요한 아데노바이러스 와 항암제의 역가는 아데노바이러스 또는 항암제를 각각 단독으로 투 여할 때의 역가와 비교하여 현저히 낮은 것임을 확인할 수 있다. 따 라서 항암제와 아데노바이러스의 병용투여를 임상에 적용할 경우, 치 료효과는 유지하면서도 필요한 아데노바이러스와 항암제의 투여량을 감소시킬 수 있을 것으로 예상된다. 이러한 방안은 아데노바이러스에 의한 간독성의 감소는 물론 인체 내 면역반응을 최소화할 수 있으며 항암제에 의한 부작용도 현저히 감소시킬 수 있을 것으로 추정되기 때문에 암 유전자 치료에 보다 더 안전하고 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 기대되는 바, 추후의 연구를 통하여 이에 대한 가능성의 규명 이 필요하리라 생각된다. V.결론

본 연구에서 이용한 Ad-ΔE1B19/55 아데노바이러스는 E1B 19kDa 단백질의 소실로 항암제에 의한 세포고사를 효과적으로 유도함으로써 Ad-ΔE1B55보다 빠른 세포살상 효과를 초래한다. 따라서 항암제와 Ad-ΔE1B19/55의 병용투여는 아데노바이러스의 암세포 내 증식에 의 한 세포살상 뿐 아니라 항암제에 의한 세포 살상을 효과적으로 촉진 함으로써 더욱 개선된 항암효과를 유도할 수 있다. 특히 여러 항암제 들 중 paclitaxel은 아데노바이러스와 함께 투여하였을 때 바이러스의 생산량을 증가시키는 효과도 있어 paclitaxel과 Ad-ΔE1B19/55의 병용 투여는 보다 효과적인 항암효과를 유도할 수 있을 것으로 예상된다. 따라서 임상에서 Ad-ΔE1B19/55와 paclitaxel을 병용투여하면, 치료효 과를 유지하면서도 아데노바이러스의 투여량을 감소시킬 수 있어 바 이러스에 의한 독성과 인체 내 면역반응을 최소화할 수 있을 것으로 예상된다.

#### Ⅵ. 참고문헌

- Runnebaum IB. Basics of cancer gene therapy. Anticancer Res 17:2887–2890,1997
- 2. Bishop JM. Cancer: what should be done? Science 278:995–998, 1997
- Bailar JC and Gornik HL. Cancer uninfected. N. Engl. J. Med 1997; 336:1569–1574.
- Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. Science 1996; 274:373–376
- Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, Arseneau J, Kuhn J, McCarty T.Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial.cancer reasearch 2000;60:6359-6366.
- Lee H, Kim J, Lee B, Lee Y, chang JW, Ahn J, et al Evaluation of E1B55kDa-deleted YKL-1 recombinant adenovirus: Correlation with p53 functional status. Int J Cancer 2000;88:454-463
- 7. Chiou SK. Tseng CC, Rao L, White E. Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2in the inhibition of apoptosis in infected cells.1994;68(10):6553-6566
- 8. Han J, Sabbatini P, Perez D, Rao L, Modha D, White E. The

E1B 19K-protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. Gene Dev 1996; 10:461-477

- Haung DC. Cory S, Strasser A. Bcl-2, Bcl-XL adn adenovirus protein E1B19kD functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. Oncogene 1997;14:405-414
- 10. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L et al a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. Nat Med 2000; 6: 879–885
- Kirn D, Martuza RL, Zwiebel J. Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. Nat Med 2001;7: 781–787
- 12. Xiang J, Gomez-Navarro J, Arafat W, Liu B, Barker SD, Alvarez RD et al. Pro-apoptotic treatment with an adenovirus encoding Bax enhances the effect of chemotherapy in ovarian cancer. J Gene Med 2000; 2: 97–106
- Ge Z, Feng Y, White DA, Schauer DB, Fox JG. Genomic characterization of Helicobacter hepaticus: ordered cosmid library and comparative sequence analysis. Das Cancer letters 165:2001:147-153
- 14. Portella G, Scala S, Vitagliano D, Vecchio G, Fusco A. ONYX-015, an E1B gene-defective adenovirus, induces cell

death in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. J Clin Endocrinol Metab 2002 Jun;87(6):2525-31

- Mittereder N, March KL, Trapnell BC. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. J Virol 1996;70:7498–7509
- Nyberg-Hoffman C, Shabram P, Li W, Giroux D, Aguilar-Cordova E. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. Nat Med. 1997 Jul;3(7):808–11
- Kim JS, Lee BY, Kim JA, Ahn JB, Park JO et al, Evaluation of E1B mutant replicating adenoviruses for cancer gene therapy. J Korean Cancer Assoc 2000;32(1):200–209.
- Nemunaitis J, Ganly I, Khuri F, Arseneau J, Kuhn J, McCarty T. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial.cancer reasearch 2000;60:6359–6366.
- 19. Cheon J, Ko SC, Gardner TA, Shirakawa T, Gotoh A, Kao C et al. Chemogene therapy: osteocalcin promoter-based suicide gene therapy in combination with methotrexate in a murine osteosarcoma model. Cacer gene Ther 4:359–365.1997
- 20. Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L et al. a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck

cancer. Nat Med 2000;6;879-885.

- 21. Ueno NT, Bartholomeusz C, Herrmann JL, Estrov Z, Shao R, Andreeff M, Price J et al. E1A-mediated paclitaxel sensitization in HER-2/neu-overexpressing ovarian cancer SKOV3. ip1 through apoptosis involving the caspase-3 pathway. Clin cancer Res 2000;6:250-259.
- 22. Gplkul C. Das Cancer letters 165:2001:147-153.

#### Abstract

## Anti-tumor Effect of *E1B*-mutant Replication Competent Adenovirus Combined with Chemotherapeutic agent

A-Rum Yoon

Departmenet of Medical Science The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor chea-Ok Yun)

Gene attenuated replication competent adenoviruses are being developed as novel anti-tumor therapeutics. Clinical trials with the ?E1B55 (E1B 55kDa-deleted) adenovirus in combination with a chemotherapeutic agent, taxol, have demonstrated a synergistically lethal effect. All replicating adenoviruses used in combination therapy have their E1B19 gene in tact. Because the E1B19 protein is an anti-apoptotic agent, adenoviruses retaining their E1B19 gene may cause a possible anti-apoptotic effect contrary to the apoptotic effect of taxol diminishing the overall potency of the combinatorial therapy.

In this study, we investigated the possibility of enhanced oncolytic and replication ability of combining E1B19-mutant adenoviruses (Ad-?E1B19/55) with taxol. In such a strategy, cell death caused by the E1B19-mutant adenoviruses and the apoptotic effect caused by taxol will combine for an overall synergy effect in killing cancer cells. The *in vitro* efficacy of adenovirus and taxol has been evaluated by the CPE assay and MTT assay. Our results show that the degree of cytopathic effect of Ad- $\Delta$ E1B19/55 was higher than that of Ad- $\Delta$ E1B55. Furthermore, compared with a virus-only treatment, an enhanced cytopathic effect was shown when the two factors were applied together. Our results from PI staining and TUNEL assay also demonstrated that the Ad- $\Delta$ E1B19/55 infected cells or taxol treated cells cause greater induction of apoptosis compared to Ad- $\Delta$ E1B55 infected cells or virus-only infected cells. The synergy effect of this combinatorial therapy has also been verified through an *in vivo* study.

Taken together, the E1B19kDa-deleted (Ad- $\Delta$ E1B19/55) replication competent adenovirus may serve as an enhanced vector for anti-cancer gene therapy, especially when applied in combination with apoptotic chemotherapeutic agents such as taxol.

.....

Key Word : oncolytic adenovirus, chemotherapeutic agent, combination therapy