



암 유전자 치료제의 개발 현황

정 인 재

덕성여자대학교 약학대학

Cancer Gene Therapy : History and Major Developments

Injae Chung

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Received August 23, 2003; Accepted August 30, 2003

ABSTRACT. Medicine is undergoing a revolution in the understanding of the mechanisms through which disease processes develop. The advent of genetics and molecular biology to oncology not only is providing surrogate predictors of therapy response and survival which are forming the basis for selection among established treatment options, but is providing targets for new directions in therapy as well. Molecular modification of somatic cells for the purposes of protecting the normal cells from the toxicity of cancer chemotherapy, for the sensitization of the tumor cells to therapy and use of conditionally replicating viral vector have been new directions of cancer treatment which have reached the clinical arena. Advances in molecular pharmacology and vector design summarized in this paper may provide solutions to some of the existing problems in the technology of gene transfer therapy. Continued basic research into the biological basis of human disease, systemic studies of the application of these discoveries to therapy and the improvement of vector for gene delivery all combined may result in advances in this important field of therapy over the next few years.

Keywords: Cancer gene therapy, Viral vector, Gene transfer.

암 유전자 치료제의 개발 현황

본고의 목적은 기존의 항암치료요법 즉 chemotherapy와 radiation therapy의 효과를 증강시키기 위하여 개발되고 있는 체세포의 유전형질전환 방법을 고찰하고 향후 이 분야의 주요 개발 방향을 조명하고자 함이다. 연구범위는 화학요법제의 독성을 감소시킬 목적으로 정상세포에 항암제내성유전자(chemotherapy resistance gene)를 도입하는 것과 암세포의 항암제에 대한 민감성을 증가하는 유전자(chemotherapy sensitization gene)를 도입하는 것을 중심으로 고찰하였다. 내용에 언급된 데이터의 선택은 상기한 연구목적에 부합한 유전자의 종류, 목적 조직에 유전자를 전달하는 방법 및 전임상실험과 임상실험의 발전과정을 판단하기에 적합한 것을 취득하였다.

Correspondence to: Injae Chung, College of Pharmacy, Duksung Women's University, 419 Dobong-gu, Ssangmoon-dong, Seoul 132-714, Korea
E-mail: ijchung@duksung.ac.kr

함의 발전과정을 판단하기에 적합한 것을 취득하였다.

암 유전자 치료제의 개발 역사

유전자치료제의 개발 및 임상실험은 과거 10여 년 동안 활발히 이루어져 왔다. 원래 유전자 치료의 개념은 단일 유전자이상인 원인인 유전질환의 초기 관찰에서 발전되었다. 이들 질환은 이론적으로 변이 또는 결손이 된 유전자의 정상 본(copy)을 삽입하여 발현시키면 궁극적으로 완치될 가능성을 지니고 있다. 1990년 미국 NIH의 Anderson 박사팀에 의해 adenosine deaminase 유전자이상질환인 섬유성 낭종(cystic fibrosis, CF) 환자에 대한 임상실험을 시작으로 수 백개의 유전자치료 임상실험이 진행되었다. 그러나 초기의 예상과는 달리 유전자치료의 주요 연구대상이 단일유전자이상 유전질환이 아닌 암과 관련된 질환으로 바뀌었는데(Marchison *et al.*, 2000), 그 이유는 단일의 질병이기 유전자는 알려져 있지만, 목적 세포로 이들 유전자를 전달하는 방법에 한계가 있었던 것이다.

CF와 같은 유전질환은 정상 유전자가 목적세포의 chromosome에 삽입되어 지속적으로 유전자를 발현하는 것이 치료의 관건이나, 초기에 개발되어 많이 사용된 retrovirus vector는 세포의 chromosome에 삽입은 되나 도입율은 만족할 만한 치료효과를 얻는 데는 미흡하였다. Retroviral vector 이후 개발된 adenoviral vector는 유전자의 도입과 발현은 일시적이긴 하지만 세포로의 도입율은 retrovirus vector와 비교하여 현저히 높은 까닭에 많이 사용되기 시작하였다. 외래성 치료유전자의 전달 도구로서 viral vector가 지녔던 한계는 영구적인 유전자발현이 절대적인 필요사항이 아닌 암을 대상으로 유전자 치료제의 개발이 더 이루어지게 하였다. 이러한 이유로 현재까지 진행된 유전자치료 임상실험의 약 70%를 암관련 유전자치료가 차지하게 되었다(Marchisone *et al.*, 2000).

많은 종류의 유전자 치료제가 다양한 말기 암의 임상실험에 시험되었고, 대부분은 치료제의 독성여부를 관찰하는 phase I 단계의 실험이었으며, 이들 실험의 결과를 요약하면, 개발된 대부분의 유전자 치료제는 일단 안전한 것으로 판명되었다는 것이다. 암 유전자 치료제의 치료효과에 대한 판정은 아직 4~5개의 적은 수가 phase III를 마치었거나 진행 중이기 때문에 결론적으로 판단하기는 이르다고 하겠다.

다만, 암 유전자 치료제가 단일유전자이상 질환 유전자 치료제 보다 수적으로는 훨씬 많이 개발되었지만, 임상적으로 장기간 만족할 만한 치료성과는 단일유전자이상 질환 유전자 치료제에서 이루어졌다. 성공한 대표적 임상실험은 비정상 γC cytokine receptor 유전자가 원인인 복합성면역결핍 X-SCID(X-linked severe combined immunodeficiency) 환자를 대상으로 프랑스에서 진행되고 있는 것이다(Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000). 이 임상실험에서는 정상 γC common cytokine receptor 유전자를 retrovirus vector에 재조합시켜 환자의 CD34+ 조혈모세포(hematopoietic stem cell)에 도입하였는데, 생후 1세 전후의 신생아 11명 중 9명이 이 방법에 의해 치료되었다. 유전자 치료제가 많은 기대에 부응하지 못하고 있던 중 신선한 자극제 역할을 한 임상실험이었다. 최초의 유전자 치료제 임상실험이 1990년 adenosine deaminase 유전자결손으로 인한 복합성면역결핍(ada-SCID)에서 이루어졌고, 유전자로 장기적으로 만족할 만한 치료효과를 얻은 것도 다른 종류의 복합성면역결핍인 X-SCID에서 이루어진 것이다.

그러나, 작년 이 임상실험(Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000)에 참가한 환자 11명 가운데 나머지 2명의 환자에게서 T-cell이 비정상적으로 증가하는 백혈병이 발생하였다. 알려진 사실은 두 환자의 경우 모두 γC cytokine

receptor-retrovirus vector의 provirus가 11번 염색체의 LMO-2 locus에 삽입된 것이다. 한 환자의 경우는 LMO-2의 antisense orientation으로 첫 번째 intron에 삽입되었고, 다른 환자의 경우는 sense orientation으로 exon 1의 upstream에 삽입되었다. 그러나 두 경우 모두 이 provirus의 삽입변이로 인하여 LMO-2 유전자가 과도하게 발현되는 결과를 초래하였다. LMO-2 유전자의 전사물 형태가 영향을 받은 것은 아니고 정상 산물이 과도하게 전사된 것이다. 따라서, LMO-2 유전자의 과도 발현의 원인은 retrovirus vector에 재조합된 gamma common cDNA가 LTR(long terminal repeat) promoter에 의해 조절받도록 고안되었는데, 강력한 LTR promoter가 LMO-2 유전자의 발현을 증가시킨 것으로 보인다. LMO-2 유전자의 과도발현과 T-cell의 증식과의 인과 관계에 대해서는 더 연구해야할 과제로 남아있다(FDA BRMAC meeting #34).

이번 프랑스의 임상실험 진행 중에 독성으로 나타난 백혈병은 다른 국가들의 유전자 치료 임상실험에도 지대한 영향을 끼쳤다. 현재 미국, 영국, 독일에서 진행되고 있는 유전자 치료 임상실험 가운데, retroviral vector를 조혈모세포에 도입시키는 방법이 포함된 protocol은 잠시 중단된 상태이다. 각 나라는 1) 환자의 동의서에 삽입변이로 인하여 백혈병이 발생한 사실을 명기한 동의서를 다시 받도록 요구하고, 2) 도입되는 세포의 종류가 조혈모세포인 것과 아닌 것을 구분하고, 3) 백혈병이나 이와 유사한 질환의 발생을 모니터링하는 계획의 첨가 등을 고려하여, 사례별로 임상실험을 계속 허용할 것인지의 여부를 결정할 것으로 보인다(FDA BRMAC meeting #33).

이는 암과 관련한 유전자 치료의 임상실험에도 적용된다. 예를 들어 추적연구(marking study)나 MDR(multi drug resistance)과 같은 실험의 protocol에는 retroviral vector와 조혈모세포의 사용이 포함되어 있고, suicide gene transfer/ganciclovir protocol에는 retroviral vector를 이용한다. 따라서, 향후 이들 임상실험의 계속 진행 여부 및 실험 진척 과정 중에 프랑스 사건과 유사한 제2의 암 발생과 같은 독성 출현의 여부에 큰 관심이 모아지고 있다.

유전자 치료제의 개발 역사에 가장 부정적인 영향을 끼친 것은 다름 아닌 미국 University of Pennsylvania에서 ornithine transcarbamoylase(OTC) 결핍 환자를 대상으로 진행된 임상실험 도중 adenoviral vector의 과다용량 투여 (총 4×10^{13} viral particle)로 인한 사망사건이었다. 선천성 면역 활성화로 인한 염증반응으로 야기된 급성호흡기장애(acute respiratory distress syndrome)가 직접적인 사망원인으로 추정되었다(Marshall, 1999). 국가기

관으로부터 승인 받은 protocol을 준수하지 않고 고용량을 투여한 것이다. University of Pennsylvania에서 진행되었던 모든 유전자 치료의 임상실험은 이 사망사건 이후로 중단된 상태이다.

OTC 경우나 상기한 X-SCID의 임상실험의 경우 모두 원하지 않은 사건의 발생에 vector의 용량이 중요한 원인으로 작용하는 것으로 보인다. T-cell 과다증식 백혈병이 발생한 프랑스의 X-SCID 임상실험 protocol과 영국에서 진행되고 있는 X-SCID 임상실험 protocol과 비교하여 보면, 프랑스에서는 영국보다 목적 조혈모세포 당 약 10배 정도 많은 양의 retroviral vector를 투여한 것으로 보인다(FDA BRMAC meeting #34). 이상의 대표적인 임상실험에서 보는 바와 같이 유전자전달 효율이 높으면서 안전한 vector의 개발이 최우선적으로 해결되어야 할 기술적 과제이며, 이는 유전자 치료제 개발의 역사에 돌피구가 될 것임은 자명하다.

지난 10년 동안 암유전자치료제는 tumor suppressor gene therapy, drug resistance gene therapy, suicide gene therapy, immune enhancement gene therapy 및 antiangiogenic gene therapy 등의 전략을 근간으로 많은 치료제가 개발되어왔다. 대부분이 전임상실험 단계에 머물렀지만, 오히려 초기에는 기존 화학요법제와 비교하여 phase I 임상실험에 들어갈 수 있는 가능성이 높아 보였다. 그러나 현재까지 불과 한 손으로 꼽을 정도의 수의 암 유전자 치료제만이 임상실험 phase II 또는 III 단계까지 진행되었다.

치료성 유전자의 전달방법으로 adenoviral vector가 암 유전자 치료에 많이 사용되었으며, 안전성의 문제로 자가복제가 불가능한(replication incompetent) vector가 주로 사용되었다. 하지만 자가복제불가(replication incompetent) vector는 안전한 대신 매우 제한된 비율의 세포에만 유전자를 전달하기 때문에 우수한 치료효과를 얻는데 한계가 있었다. 이를 극복하기 위하여 개발된 조건적으로 자가복제가 가능한(replication competent) vector

는 임상실험에서 매우 우수한 항암치료효과를 나타내고 있다.

최근까지 보고된 암 유전자 치료제의 전임상실험 및 임상실험의 결과를 분석하여 보면, 암을 치료하는데 유전자요법 단독 사용보다는 기존의 치료방법 즉 화학요법, 방사선요법, 면역요법과 병행하여 상승적인 치료효과를 기대하는 것이 보편화 될 것으로 보인다. 본고에서는 암유전자요법의 활용에 있어 화학요법제의 역할에 주시하며, 암유전자치료제의 주요 개발현황 및 방향에 관하여 논하고자 한다.

Chemoprotection 전략: 억제내성유전자의 활용: 정상세포를 항암화학요법제의 독성으로부터 예방: 유효한 용량의 화학요법제를 투여하는데 가장 중요한 장애의 하나는 정상세포에 나타나는 독성이다. 민감한 정상세포에 자가복제불가 viral vector를 이용하여 억제내성유전자(예, Table 1 참고)를 도입하여 화학요법제의 독성을 피하는 전략이다. 골수 아세포에 억제내성유전자를 도입하면, 70 Kg의 환자가 감염 저항력에 필요한 200 billion/day의 호중구를 생산하게 하면서 상용 또는 고용량의 화학요법을 실시할 수 있다. 물론 이 방법은 암이 골수로 전이되지 않은 환자를 선택하여, 골수의 세포에 억제내성유전자가 도입되지 않도록 적용한다(Deisseroth *et al.*, 1996).

Fig. 1과 Table 1에 chemoprotection 전략과 관련된 유전자 및 화학요법제의 예를 보여주고 있는데, dihydrofolate reductase gene과 methotrexate, multidrug resistance gene과 intercalator 약물(예, periwinkle alkaloid, epipodophyllotoxin, taxan, homoharrintonine 등의 alkaloid), alkyl methyl guanine transferase gene과 nitrosourea, cytidine deaminase gene과 cytosine arabinoside, glutathione S-transferase gene과 alkylating 약물(예, chlorambucil, mechlorethamine), 및 acetaldehyde dehydrogenase gene과 cyclophosphamide와 ifosfamide 등이 포함된다. 이들 유전자들은 정상 골수세포의 관련 약물에 대한 반응성을 감소시킨다.

Table 1. Chemoprotection system

Gene	Drug	Rationale
Dihydrofolate Reductase (DHFR)	Methotrexate (MTX)	Elevated level of target enzyme
P-Glycoprotein (MDR-1)	Taxanes, Anthracyclines, Periwinkle Alkaloids, Epipodophyllotoxins	Augmented drug-efflux from the cells
Glutathione-S-Transferase (GST-2)	Alkylating Agents (Chlorambucil, Mechloethamine)	Increased conjugation of glutathione to toxic agents
Cytidine Deaminase	1-β-D-arabinofuranosylcytosine (Ara-C)	Deamination of Ara-C inactivates the drug
Aldehyde Dehydrogenase (ALDH-1)	4-Hydroxycyclophosphamide (active metabolites of cyclophosphamide)	Augmented dehydrogenation and inactivation of the agent
O6-Alkylguanine-DNA-alkyltransferase	Nitrosoureas	Increased DNA repair mechanism

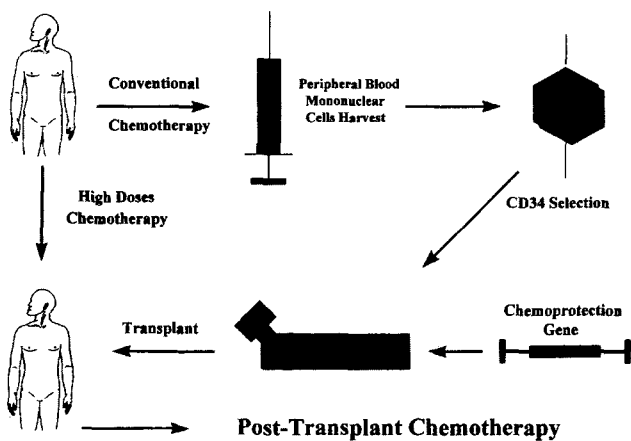


Fig. 1. Chemoprotection gene transfer to protect CD34+ hematopoietic stem cell from chemotherapy.

임상실험에서 가장 많이 실험된 약제내성유전자는 다약제내성유전자(multidrug resistance gene, MDR)인데, 이 유전자를 정상 조혈세포에 도입시켜 골수이식 후 화학요법에 대한 감수성을 감소시키는데 적용되었다(Hanania *et al.*, 1996; Rahman *et al.*, 1998). MDR-1 유전자의 산물은 ATP-dependent transmembrane pump(Fig. 2)로서 항암제를 세포 안에서 밖으로 배출하여 세포 독성을 차단하는 기능을 지니고 있다.

Chemosensitization 전략: suicide 유전자 또는 pro-drug activation 유전자의 활용: 암세포를 화학요법에 민감하게 전환하여 세포독성 유도: 화학요법을 실시할 때 정상세포에 대한 독성을 감소시켜 치료계수를 증가시키는 다른 전략은 chemotherapy sensitization gene (Table 2 참고)을 종양세포에 도입하여 약물에 대한 감수성이 생기게 하는 것이다. Chemotherapy sensitization gene은 suicide gene으로도 알려져 있는데, 이들 유전자

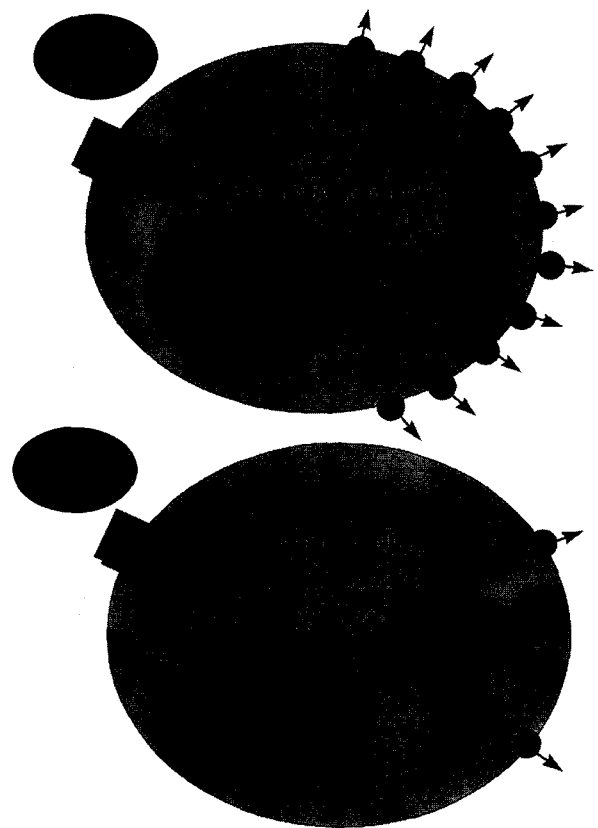


Fig. 2. Use of MDR-1 chemoprotection gene for cancer gene therapy.

는 효력이 없는 전구약물(prodrug)을 세포독성이 있는 약물 대사체로 전환하는 데 관여를 한다(Moolten, 1986). 이 방법은 비교적 독성을 일으키지 않을 정도의 약물 또는 방사선의 용량으로 종양세포의 제거를 가능케 한다.

또한 chemotherapy로부터 정상세포를 보호하면서 종양세포의 화학요법에 대한 내성 문제를 동시에 극복하

Table 2. Chemosensitization system

Gene	Prodrug	Anticancer agent
Cytosine Deaminase (Escherichia Coli)	5-Fluorocytosine	5-Fluorouracil
Thymidine Kinase (Herpes Simplex Virus)	Ganciclovir	Ganciclovir Triphosphate
Purine Nucleoside Phosphorylase (Escherichia Coli)	6-Merthylpurine-deoxyriboside	6-Methylpurine
Cytochrome P450 (Rat Liver)	Cyclophosphamide Ifosfamide	4-Hydroxy-Cyclophosphamide 4-Hydroxy-Ifosfamide
Nitroreductase (Escherichia Coli)	5-Aziridin 2,4-Dinitrobenzamine (CB1954)	5-Aziridin 2,4-Hydroxyamino-2-Nitrobenzamine
Carboxypeptidase G2 (Escherichia Coli)	4-[(2-Chloroethyl)(2-Mesyloxyethyl)Amino]Benzoyl-L-Glutamic Acid (CMDA)	4-[(2-Chloroethyl)(2-Mesyloxyethyl)Amino]Benzoic Acid
Phosphoribosyl-transferase	5-FU	5-FUMP

는 것이 가능하다. 이는 chemotherapy sensitization 유전자를 종양세포에만 선택적으로 도입하거나 혹은 이들 유전자의 발현을 목적하는 종양세포로 제한하는 vector 시스템을 이용하면 실현될 수 있다. 이 시스템은 저용량의 약물이 정상세포에는 무독하나 종양세포에는 결정적으로 유독한 효과를 나타내게 한다. Prodrug 활성화 유전자가 충분히 발현되어 약물 대사효소의 작용을 필요한 만큼 높일 수 있다면, 현재 가장 강한 화학약제의 전신투여 치료로 얻을 수 있는 것보다 훨씬 높은 농도의 항암제를 종양세포 내에 존재할 수 있게 만들 수 있다(Chung *et al.*, 1999). 분열하는 세포 뿐 아니라 분열하지 않는 세포에도 작용하는 prodrug/drug을 잘 선택하면, 두경부암, 직장암, 위암, 췌장암, 폐암, 유방암, 난소암 및 전립선암과 같이 느리게 자라는 상피세포 종양에도 치료결과에 개선을 가져올 수 있다.

전임상실험에서 임상실험 phase III까지 가장 광범위하게 연구된 시스템은 항바이러스제인 ganciclovir를 활성화시키는 HSV-tk(herpes simplex virus thymidine kinase)이다. 이 전략은 1) vector에 의해 도입된 HSV-tk 효소에 의한 ganciclovir(GCV)의 monophosphate 형태로의 전환 및 2) 세포내 효소에 의한 ganciclovir triphosphate의 생성에 근거하고 있다. Triphosphate 대사체는 deoxyguanosine triphosphate의 상경적 저해제로서 DNA polymerase를 불활성화시키고, DNA에 삽입되어 사슬의 연장을 차단한다(Moolten, 1986).

상기한 HSV-tk/gcv 시스템의 항암효과는 DNA 합성기구의 차단과 관련되므로, 세포의 분열 여부는 이 시스템의 성공에 매우 중요한 영향을 미친다. 따라서 이 시스템은 비교적 느리게 분열하는 암세포에는 치료효과가 높지 않다고 하겠다. 세포주기에 관계없이 적용할 수 있는 시스템으로는 CD(cytosine deaminase)/5FC(5-fluorocytosine)이 있다. CD 유전자는 사람의 게놈에는 없고 곰팡이나 세균에 존재하며, 이 유전자의 산물은 곰팡이 또는 세균 감염치료제로 사용되는 5-FC를 사람 세포에 대한 독성이 있는 5-FU(5-fluorouracil)로 전환한다. 5-FU는 DNA 뿐 아니라 RNA에도 삽입되어 단백질의 합성을 차단하므로 결국 분열하고 있지 않은 세포의 세포사도 초래한다(Huber *et al.*, 1993). 5-FU는 또한 radiation sensitizer이기도 하다. 현재 임상에서 많이 사용되고 있는 화학요법제인 5-FU를 직접 투여하는 것에 비해, CD/5-FC의 시스템의 장점은 종양세포내 5-FU의 농도를 100~1000배나 높일 수 있다는 것이다.

CD/5-FC와 HSV-tk/gcv 시스템 모두 상당한 세포사의 결과를 얻는데, 'bystander effect'가 매우 중요하게 작용한다(Freeman *et al.*, 1993). 즉, suicide enzyme을 발

현하는 세포들은 prodrug이 활성화된 결과로 세포사가 야기 되는데, viral vector에 감염되지 않은 주변 세포들도 같이 제거되는 효과이다. 적어도 동물실험에서는 10% 정도의 암조직에만 viral vector에 의해 치료유전자가 전달되어도 나머지 부분의 암에도 억제 효과가 나타난다. 유전자 도입을 위해 현재 많이 사용하고 있는 방법은 자가복제불가 viral vector인데, *in vitro* 실험의 경우 세포내 viral vector 도입율이 5~95%이고 실제 임상에서는 투여경로에 따라 다르나 직접 암조직에 주사하는 경우일 지라도 도입률은 만족할 만한 수준이 아니다. 따라서, 암 유전자 치료에 있어 유전자도입효율은 가장 중요한 제한인자로 작용하고 있어, 자가복제불능 viral vector를 전달 도구로 사용할 경우 bystander effect는 치료에 지대한 영향을 끼친다. Bystander effect의 기전은 감염된 세포에서 생성된 세포독성 대사체가 gap junction을 통한 주변의 세포로의 도입, viral vector에 감염되어 죽어가는 세포에서 발생한 apoptotic vesicle의 식작용, 세포막을 통한 paracrine, 죽어가는 세포에서 유리된 IL-1과 같은 물질에 의한 면역반응 등에 의한 것으로 알려져 있다. CD가 HSV-tk나 유사한 다른 시스템에 비교하여 bystander effect가 크다는 것은 매우 유리한 치료효과를 얻을 가능성을 높여준다(Huber *et al.*, 1994).

CD/5FC vector 시스템은 여러 가지 특징이 부가된 vector로 계속 개발되었다. 미국 Sidney Kimmel Cancer Center의 Deisseroth과 본 연구자의 연구실에서 개발된 것을 예를 들어보면, L-plastin과 같은 종양세포에서만 발현되는 유전자의 promoter를 이용하여 CD 유전자가 종양세포에서만 작동하도록 개선되기도 하고(Chung *et al.*, 1999), 아데노바이러스가 종양세포에서만 선택적으로 복제되면서 CD/5FC 시스템을 지닌 것으로 진화하기도 하였다. Adenoviral vector의 replication에 필수인 E1A 단백질과 치료유전자인 CD 발현이 L-plastin promoter 통제아래 둔 것이다. Adenoviral vector를 이용한 암 유전자 치료에서 부딪치는 장애는 종양세포의 수가 환자에 투여되는 viral vector의 수 보다 훨씬 상회하는 것인데, viral vector를 조건적으로 종양세포 내에서 자가복제가 일어나게 하는 것은 이 수자의 차이로 인한 장애를 해결할 수 있을 것으로 기대된다(Akbulut *et al.*, 2003). L-plastin과 같이 종양세포 또는 조직 특이적으로 작동하는 promoter의 예는 Table 3에 정리하였다.

최초의 CD/5FC 시스템에 대한 임상실험은 미국 코넬의 과대학의 Dr. Crystal 연구팀이 이끌었다(Crystal *et al.*, 1997). 간에 전이된 말기 직장암 환자를 대상으로 실시되었던 실험이었다. CD 유전자는 자가복제불가 adenoviral vector를 이용하여 전달되었다. Crystal은 원래 흉부내과

Table 3. Tumor specific promoter

Tumor type	Promoter
Prostate	PSA Probasin
Lung	Myc/Max binidng sequence CD24 CEA
Breast	DF3 h-Lactoalbuminovin-lactoalbumin erbB-2
Melanoma	Tyrosinase
Glioma	Myelin basic protein
Hepatocellular	Alpha-feto-protein
Osteocarcinoma	Osteocalcin
Neuroblastoma	Midkine
Wilms' tumor	
Epithelial cell orgin cancer	L-plastin

의사로서, 유전자 치료 분야에서 그의 창의적인 기여 중 하나는 현재 가장 많이 사용되고 있는 adenoviral vector를 유전자 치료에 최초로 활용했다는 점이다. 뉴욕 맨하탄을 조강하면서 얻은 아이디어라고 하는데, 호흡기내과 의사로서 호흡기질환의 원인 바이러스인 adenovirus를 외래 유전자의 전달 도구로 떠올렸던 것이다.

이보다 개선된 CD/5FC의 시스템으로 임상실험 phase I 실험이 진행되었던 것은, CD 유전자의 발현이 유방암에서만 일어나도록 조직특이적 promoter를 사용한 vector이었다. 유방암 표적 promoter는 erbB-2 유전자의 것을 활용하였는데, 전체 유방암 환자의 20%에서 erbB-2가 과도발현이 되며, 이는 유방암의 나쁜 예후와 관련이 있는 것으로 알려진 유전자이다. 이런 프로파일을 지닌 유방암 환자를 선택하여 적용하였다(Pabdh et al., 1999).

한 vector에 CD 유전자 이외에 uracil phosphoribosyl-transferase과 같은 유전자를 첨가하여 두 개의 전사단위를 지닌 자가복제불가 viral vector들이 개발되고 있다 (Chung-Faye et al., 2001). 다른 한편에서는 임상실험 phase I 에서도 테스트된 바와 같이 두 개의 suicide 유전자 즉, CD 유전자와 상기한 HSV-tk 유전자를 한 vector에 재조합시켰는데(Ad-CD/TKrep), 사용된 adenoviral vector는 후에 기술될 ONXY-015 vector에 근간하여 제조되었기 때문에 비정상적 p53 유전자가 존재하는 암세포에서만 자가복제가 일어나는 vector이다. Ad-CD/TKrep vector는 자가복제가능 adenoviral vector이면서 두 개의 suicide 유전자를 지닌 매우 공격적인 vector라 할 수 있겠다. 전립선암 환자를 대상으로 한 phase I 임상실험에서 이 vector의 안전성은 확보되었고, 암억제 효과도 관찰되었다(Freytag et al., 1998, 2002a). 또한 이 vector는 마우스 전립선암 모델에서 방사선치료와 병용하였을 때, 개선된 치료효과를 나타낸 것으로 보아 자가복제가능,

이중 suicide gene/prodrug 시스템 및 방사선요법이 병용된 protocol이 곧 임상실험에 들어갈 것으로 보인다 (Freytag et al., 2002b).

그 외 분열 상태에 관계없이 종양세포를 제거하기 위하여, 세포주기 비의존성 화학요법제 계열인 알킬화 약물(alkylating agent)의 활성화를 유도하기 위한 유전자 치료 시스템들이 개발되었다. Cytochrome P450 유전자와 cyclophosphamide 혹은 ifosfamide를 사용하여 각기 약리활성을 지닌 4-hydroxy 대사체로 전환하는 것이 백혈병, 뇌, 유방암 모델에서 연구되었다. 박테리아의 nitro-reductase 유전자로 prodrug CD1954를 bifunctional 알킬화 약물로의 전환 및 carboxypeptidase G2 유전자로 CMDA를 알킬화 약물작용이 있는 benzoic acid 대사체로의 전환 등이 분열되는 않는 종양세포를 제거하기 위해 고안된 시스템의 예이다.

EX VIVO 전달 시스템: chemosensitization 유전자를 종양세포에 선택적으로 전달: 자가골수이식 또는 자가말초혈액이식의 샘플에 전이된 종양세포의 정화: Adenoviral vector에 대한 세포의 감염 감수성은 세포 표면의 1) adenoviral vector의 fiber와 결합하는 CAR(coxsackievirus and adenovirus receptor) 및 2) adenoviral vector의 penton base와 결합하는 integrin receptor, 특히 $\alpha\beta5$ 와 $\alpha\beta3$ 에 의존한다. 그런데, 이러한 세포 표면의 receptor들이 상피세포에는 존재하나 분화 초기단계의 조혈세포에서는 발견되지 않는다. 이런 차이는 소위 purging(정화), 즉 고용량 화학요법의 독성 감소를 위해 병행하는 자가골수이식 또는 자가말초혈액 이식의 샘플에 오염된 상피성 종양세포를 효율적으로 제거하는 것에 이용될 수 있다(Seth et al., 1996). Prodrug 활성화 유전자 전사단위를 함유한 adenoviral vector와 prodrug을 동시

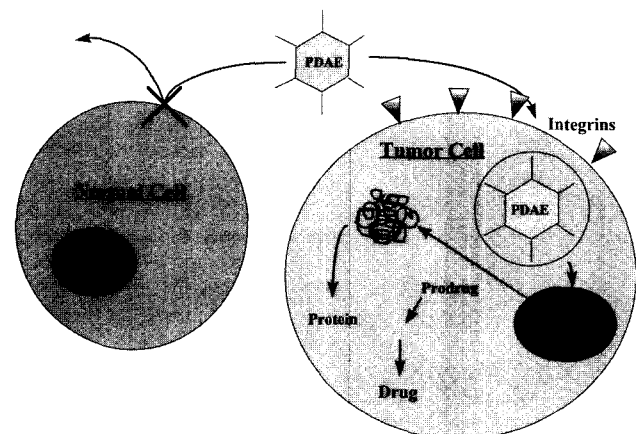


Fig. 3. Ex vivo purging by chemosensitization gene transfer to tumor cells (PDAE : prodrug activating enzyme).

에 샘플에 적용하면 종양세포만 선택적으로 제거된다. Ex vivo chemosensitization이 가능한 것이다(Fig. 3).

유방암 환자의 자가골수이식용 샘플에 adenoviral CD/5-FU 시스템을 적용한 purging의 가능성이 보고 되었고 (Garcia-Sanchez *et al.*, 1998), 같은 시스템을 이용하여 스페인에서 phase I 임상실험이 이루어져 이 방법이 안전하며 유효한 purging 방법임을 보여 주었다(Lillo *et al.*, 2002).

Adenoviral carboxylesterase/irinotecan 시스템도 neuroblastoma 환자의 purging에 사용될 수 있을 것으로 보이며, ex vivo chemosensitization을 위해 많은 시스템이 개발될 것이다.

Delivery systems

치료유전자(therapeutic gene)의 전달을 위해 여러 가지 자가복제불가 vector들이 개발되었다. Table 4는 대표적인 vector들의 장점 및 단점을 나타내고 있다. 이들 vector들은 용해성 감염에 필요한 바이러스 유전자 부분이 치료유전자로 대체된 것들이다. Retrovirus와 adeno-associated viral(AAV) vector는 DNA를 적중 세포의 chromosome에 삽입할 수 있어 장기간 또는 평생 동안 치료유전자의 발현이 필요한 경우 사용되는 vector들이다. 조혈모세포의 유전자 전달에 많이 사용되었으며 분열 중인 세포에 유전자를 도입한다. Retroviral vector는 AAV vector 보다는 수월하게 대량 생산이 가능하지만 불안정한 것이 단점이기도 하다. 상기한 바와 같이 작년 X-SCID 임상실험에서 retroviral vector에 대한 random integration에 대한 염려가 실제로 나타면서 현재 이 vector의 안전성에 대한 우려가 더욱 높아졌고 아직 이 vector를 사용하는 임상실험의 재개가 완전 이루어져 있지 않은 상태이다.

Table 4. Vector gene delivery systems

Vector	Strenths	Weakneses
Retrovirus	Integration Easy production	Cell cycle dependent Capsid unstable Low titre Random integration
AAV	Integration Capsid stable	Cell cycle dependent Hard to produce
Adenovirus	Wide host range Capsid stable High titre Easy production Cell cycle independent	Immunogenic Replication competent adenovirus hard to avoid
Herpes simplex	CNS tropism	Large complex genome
Lentivirus	Intergrates into quiescent cells as well as dividing cells	No immune response Safety untested

Adenoviral vector는 치료유전자를 적중 세포의 chromosome에는 삽입하지 않기 때문에 치료유전자의 발현이 일시적이며, 세포의 분열 상태와는 무관하게 작동한다. 상기한 바와 같이 vector의 세포결합과 세포 내로의 도입에 있어, 분화초기의 조혈모세포보다는 상피세포에 대한 선택성을 가지고 있다. Herpes viral vector는 중추신경계 세포의 유전자 도입에 사용되어왔다.

최근 관심을 받기 시작한 vector로서 human immunodeficiency virus(HIV)를 기본 골격으로 개발된 lentiviral vector가 있다. Lentiviral vector가 신경, 근육세포와 같은 거의 분열하지 않는 세포에도 외래유전자를 chromosome에 삽입하여 장기간의 유전자 발현을 가능하게 한다는 것이 알려진 이후(Kafri *et al.*, 1997), 단일유전자 이상 유전자 치료(replacement gene therapy) 분야에서 많은 관심을 받고 있다. Retroviral vector는 분열 중인 세포에만 유전자를 삽입하기 때문에 도입효율을 증대하기 위하여 세포분열을 유도하기도 하는데, lentiviral vector는 그럴 필요가 없다. 이와 더불어 장기간 치료성 유전자의 발현, 개선된 유전자 도입효율 등으로 retroviral vector의 자리를 대체할 것으로 보인다. 현재 이 vector의 안정성에 대한 임상실험이 진행 중인 것으로 보이나 보고된 것은 없다(MacGregor, 2001).

임상실험 phase II와 III에서 테스트된 대표적 암 유전자 치료제

-HSV-tk: HSV-tk/GCV시스템은 가장 많이 연구된 유전자요법이며, 대표적인 대상 질환은 glioma이다. 다양한 전달 방법으로 진행되었는데, 제조합 vector를 정제하지 않고 retroviral vector-HSV-tk를 생산하는 세포(producing cell)를 종양부위에 직접 주사하는 protocol이 다용되었다. Phase II-III까지 실시되었는데, 전반적으로 독성은 없었으나 치료효과는 기대이하인 것으로 나타났다(McCormick, 2001; Shand *et al.*, 1999). 임상실험에서 retroviral vector 보다는 adenoviral vector를 사용하는 것이 항암 치료효과를 얻는 데 유리하며(Snadmair *et al.*, 2000), HSV-tk/GCV 시스템의 현재까지의 임상결과를 보면 향후 치료효과의 증진을 위해 새로운 protocol의 개발이 필요한 것으로 나타났다. 그러한 노력의 일환으로 adenoviral IL-12 vector 병용(Hassan *et al.*, 2000), 알킬화제인 Temozolomide과 같은 화학요법제의 병용(Rainov *et al.*, 2001), bystander effect 증진을 위한 lovostatin과 같은 약제의 병용(Tourain *et al.*, 1998), 방사선요법과의 병용, CD와 같은 다른 suicide gene과의 병용 등이 보고 되었다. 동물실험에서 HSV-tk와 CD chemosensitization gene을 사용할 때 전달 방법 혹은 대상 질환에 따라 상반

된 결과를 보인다. 자가복제가능 adenoviral vector로 전립선암의 모델에서는 방사선치료와 상승적인 치료효과가 (Freytag *et al.*, 2002b), 자가복제가능 herpes simplex viral vector를 이용한 악성 glioma 모델에서는 단독사용보다 치료효과의 감소가 나타났다(Moriuchi *et al.*, 2002).

-Ad-p53: 암의 replacement therapy의 대표적인 유전자치료제이다. 모든 암의 약 50%에서 암억제유전자인 p53의 변이가 발견되고 있다. Adenoviral vector에 재조합되어 정상 p53이 전달되는 방법을 이용하여 임상실험 phase I, II의 실험이 이루어졌으며, phase III(Nemunaitis and O'Brien, 2002)가 진행되고 있다. 가장 대표적으로 연구 대상이 된 암은 NSCLC(non-small cell lung cancer)과 HNSCC(head and neck squamous cell carcinoma)이다. 임상실험에서 Ad-p53 vector 단독(Clayman *et al.*, 1998; Swisher *et al.*, 1999) 또는 화학요법제 cisplatin과의 병용(Nemunaitis *et al.*, 2000; Schuler *et al.*, 2001)이 시도되었다. Phase I, II의 결과는 시도된 protocol은 안전하며 주로 종양치료효과는 주사된 종양 부위에 한정하여 나타나는 것으로 보고되었다. Ad-p53의 치료효과 증진을 위하여 DNA 손상 약제인 cis-diaminedichloroplatinum(II)을 비롯한 여러 화학요법제와의 병용(Horio *et al.*, 2000) 또는 화학요법(예. docetaxel)/방사선요법의 병용(Nishizaki *et al.*, 2001)으로 인한 상승효과의 전임상실험 결과 보고가 계속되는 반면, NSCLC를 대상으로 여러 센터에서 이루어진 phase II 임상실험에서는 효과적인 화학요법이 실시된 경우 Ad-p53에 의한 부가효과는 관찰되지 않기도 하였다(Schuler *et al.*, 2001).

-ONYX-015: ONYX-015는 종양세포와 adenovirus의 공통 특성을 이용하여 개발된 약독 아데노바이러스주(attenuated adenovirus)로서 dl1520 또는 CI-1042으로도 알려져 있다. Adenovirus는 55K의 E1B 단백질을 생산하여 세포의 p53을 제거하는데, E1B가 p53 단백질과 결합하고 바이러스의 E4 orf6 단백질의 작용으로 세포가 사멸된다. ONYX-015 vector에 E1B 55K가 없기 때문에 세포의 p53를 제거하지 못한다. 정상세포에서는 p53 단백질이 복제를 방지하지만, p53의 비정상본을 지닌 암세포에서는 적어도 이론적으로는 ONYX-015가 복제할 수 있어 결국 세포의 사멸로 이어진다(Bischoff *et al.*, 1996). 그러나 이후 발표된 연구들에 의하면 ONYX-015는 암세포의 p53이 정상본인 암세포에서도 복제를 일으킨다고 알려지기도 하였다(Harada and Berk, 1999; Petit *et al.*, 2002). ONYX-015는 개발된 암유전자치료제 중 가장 광범위하게 임상실험이 진행된 vector이다. Head and

neck cancer 환자를 대상으로 진행된 phase II 임상실험에서 2×10^{11} pfu을 1일 1회 5일간 종양에 직접주사한 경우 30명의 환자 중 14%가 partial/complete response, 45%의 환자가 progressive disease를 보였다. 한편 같은 용량의 particle을 1일 2회 2주간 종양에 직접 주사한 경우 10명 중 10%가 complete response를 보였으나 progressive disease율은 29%였다(Nemunaitis *et al.*, 2001). 그러나 임상실험 phase III까지 마친 ONYX-015와 관련된 모든 프로그램을 2003년 3월 말로 중단하고 더 이상 진행시키지 않는 것으로 알려졌다(개인 교신). 따라서 시장에 ONYX-015가 나오진 못하겠지만, 이러한 과정에서 많은 정보를 얻을 수 있었고 암 유전자 치료제의 개발 방향에 지대한 영향을 끼쳤다.

-G207과 CN706: G207은 약독화된 자가복제가능 herpes simplex virus(HSV)로서 바이러스의 rintonucleotide reductase의 불활성화와 gamma(1)34.5 유전자를 제거함으로써, glioblastoma 세포에서 바이러스 복제가 일어나도록 고안된 바이러스이다(Mineta *et al.*, 1995). CN706 vector는 자가복제가능 adenoviral vector인데, 바이러스의 자가복제에 필요한 E1A 유전자가 전립선 조직 특이적 유전자인 prostate-specific antigen (PSA)의 promoter에 의해 발현이 조절 되도록 고안이 되었다(Rodriguez *et al.*, 1997).

맺음 말

본고에서는 개발되었던 암 유전자 치료제 중에서 화학약제 및 방사선요법과 직간접적으로 관련이 있는 것을 중심으로 살펴보았지만 이것은 이 분야의 분류에 해당하며, 가장 광범위하게 연구된 암 유전자 치료제들이다. 지금까지 전략 시스템 및 정상세포에 대한 독성을 감소시키면서 종양세포에 대한 세포독성을 증가시켜 기존 vector의 치료계수를 높이고자 하는 여러 시도들을 고찰하였다. 기존 전략의 개선 및 새로운 시스템의 개발, 두 개 전사단위의 활용, 조직 또는 종양 세포 표적 promoter의 개발 및 활용, p53 등과 같은 암 생물학의 지식을 이용하여 종양세포에서만 조건적으로 바이러스의 복제가 허락되는 vector의 개발, 암 유전자요법과 화학요법 및 방사선요법 등과 병용으로 치료 개선을 이루고자 하는 시도 등이 이루어져 왔다. 기대를 많이 받아왔던 ONYX-015가 임상실험 phase III 이후로 개발이 더 이상 진전하지 못한 사실은 암 유전자 치료제 개발의 냉혹한 현실을 보게 한다. 미흡한 유전자 치료제의 목적 종양세포로의 전달 및 viral vector에 대한 면역반응과 같은 당면 문제는 향후 몇 년

간 해결되어야 할 최우선과제이다. 이것을 해결하는 돌파구의 역할을 하는 연구자는 유전자치료 분야의 대전환을 이루는 공적을 남기게 되는 것이며 오래 동안 후학의 기억 속에 남을 것이다.

감사의 글

본 연구는 2002년 덕성여자대학교 교내연구비의 지원으로 이루어졌습니다.

참고문헌

- Akbulut, H., Zhang, L., Tang, Y. and Deisseroth, A. (2003): The cytotoxic effect of replication competent adenoviral vectors carrying L-plastin promoter regulated E1A and cytosine deaminase genes in cancers of the Breast, ovary and colon. *Cancer Gene Ther.*, **10**, 388-395.
- Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A. and McCormick, F. (1996): An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, **274**, 373-376.
- Harada, J.N. and Berk, A.J. (1999): p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J. Virol.*, **73**, 5333-5344.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Beym S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bouso, P., Deistm, F.L. and Fischer, A. (2000): Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, **288**, 669-672.
- Chung, I., Schwartz, P.E., Crystal, R.G., Pizzorno, G., Leavitt, J. and Deisseroth, A.B. (1999): Use of L-plastin promoter to develop an adenoviral system that confers transgene expression in ovarian cancer cells but not in normal mesothelial cells. *Cancer Gene Ther.*, **6**, 99-106.
- Chung-Faye, G.A., Chen, M.J., Green, N.K., Burton, A., Anderson, D., Mautner, V., Searle, P.F. and Kerr, D.J. (2001): *In vivo* gene therapy for colon cancer using adenovirus-mediated, transfer of the fusion gene cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase. *Gene Ther.*, **8**, 1547-1554.
- Clayman, G.L., el-Naggar, A.K., Lippman, S.M., Henderson, Y.C., Frederick, M., Merritt, J.A., Zumstein, L.A., Timmons, T.M., Liu, T.J., Ginsberg, L., Roth, J.A., Hong, W.K., Bruso, P. and Goepfert, H. (1998): Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Onc.*, **16**, 2221-2232.
- Crystal, R.G., Hirschowitz, E., Lieberman, M., Daly, J., Kazam, E., Henschke, C., Yankelevitz, D., Kemeny, N., Silverstein, R., Ohwada, A., Russi, T., Mastrangeli, A., Sanders, A., Cooke, J. and Harvey, B.G. (1997): Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the *E. coli* cytosine deaminase gene to metastatic colon carcinoma of the liver in association with the oral administration of the pro-drug 5-fluorocytosine. *Human Gene Ther.*, **8**, 985-1001.
- Deisseroth, A.B., Holmes, F., Hortobagyi, G. and Champlin, R. (1996): Use of safety-modified retroviruses to introduce chemotherapy resistance sequences into normal hematopoietic cells for chemoprotection during the therapy of breast cancer: a pilot trial. *Human Gene Ther.*, **7**, 401-416.
- FDA (Food and Drug Administration), Center for Biologics Evaluation and Research, Biological Response Modifiers Advisory Committee, SUMMARY MINUTES Meeting #33, October 10, 2002.
- FDA (Food and Drug Administration), Center for Biologics Evaluation and Research, Biological Response Modifiers Advisory Committee, SUMMARY MINUTES Meeting #34, February 28, 2003.
- Freeman, S.M., Abboud, C.N., Whartenby, K.A., Packman, C.H., Koeplin, D.S., Moolten, F.L. and Abraham, G.N. (1993): The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.*, **53**, 5274-5283.
- Freytag, S.O., Rogulski, K.R., Paielli, D.L., Gilbert, J.D. and Kim, J.H. (1998): A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy. *Human Gene Ther.*, **9**, 1323-1333.
- Freytag, S.O., Khil, M., Stricker, H., Peabody, J., Menon, M., DePeralta-Venturina, M., Nafziger, D., Pegg, J., Paielli, D., Brown, S., Barton, K., Lu, M., Aguilar-Cordova, E. and Kim, J.H. (2002a): Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. *Cancer Res.*, **62**, 4968-4976.
- Freytag, S.O., Paielli, D., Wing, M., Rogulski, K., Brown, S., Kolozyvary, A., Seely, J., Barton, K., Dragovic, A. and Kim, J.H. (2002b): Efficacy and toxicity of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy in combination with radiation therapy in an orthotopic mouse prostate cancer model. *Int. J. Rad. Onc. Bio. Phys.*, **54**, 873-885.
- Garcia-Sanchez, F., Pizzorno, G., Fu, S.Q., Nanakorn, T., Krause, D.S., Liang, J., Adams, E., Leffert, J.J., Yin, L.H., Cooperberg, M.R., Hanania, E., Wang, W.L., Won, J.H., Peng, X.Y., Cote, R., Brown, R., Burtness, B., Giles, R., Crystal, R. and Deisseroth, A.B. (1998): Cytosine deaminase adenoviral vector and 5-fluorocytosine selectively reduce breast cancer cells 1 million-fold when they contaminate hematopoietic cells: a potential purging method for autologous transplantation. *Blood*, **92**, 672-682.
- Hanania, E.G., Giles, R.E., Kavanagh, J., Fu, S.Q., Ellerson, D., Zu, Z., Wang, T., Su, Y., Kudelka, A., Rahman, Z., Holmes, F., Hortobagyi, G., Claxton, D., Bachier, C., Thall, P., Cheng, S., Hester, J., Ostrove, J.M., Bird, R.E., Chang, A., Korbling, M., Seong, D., Cote, R., Holzmayer, T. and Deisseroth, A.B. (1996): Results of MDR-1 vector modification trial indicate that granulocyte/macrophage colony-forming unit cells do not contribute to posttransplant hematopoietic recovery following intensive systemic ther-

- apy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15346-15351.
- Hassan, W., Sanford, M.A., Woo, S.L., Chen, S.H. and Hall, S.J. (2000): Prospects for herpes-simplex-virus thymidine-kinase and cytokine gene transduction as immunomodulatory gene therapy for prostate cancer. *World J. Urol.*, **18**, 130-135.
- Horio, Y., Hasegawa, Y., Sekido, Y., Takahashi, M., Roth, J.A. and Shimokata, K. (2000): Synergistic effects of adenovirus expressing wild-type p53 on chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Cancer Gene Ther.*, **7**, 537-544.
- Huber, B.E., Austin, E.A., Good, S.S., Knick, V.C., Tibbels, S. and Richards, C.A. (1993): *In vivo* antitumor activity of 5-fluorocytosine on human colorectal carcinoma cells genetically modified to express cytosine deaminase. *Cancer Res.*, **53**, 4619-4626.
- Huber, B.E., Austin, E.A., Richards, C.A., Davis, S.T. and Good, S.S. (1994): Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8302-8306.
- Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D.A., Gage, F.H. and Verma, I.M. (1997): Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nature Gen.*, **17**, 314-317.
- Lillo, R., Ramirez, M., Alvarez, A., Santos, S., Garcia-Castro, J., Fernandez de Velasco, J., Aviles, M.J., Gomez-Pineda, A., Diez, J.L., Balas, A., Vicario, J.L., Bueren, J.A. and Garcia-Sanchez, F. (2002): Efficient and nontoxic adenoviral purging method for autologous transplantation in breast cancer patients. *Cancer Res.*, **62**, 5013-5018.
- MacGregor, R.R. (2001): Clinical protocol. A phase 1 open-label clinical trial of the safety and tolerability of single escalating doses of autologous CD4 T cells transduced with VRX496 in HIV-positive subjects. *Human Gene Ther.*, **12**, 2028-2029.
- Marchisone, C., Pfeffer, U., Del Grosso, F., Noonan, D.M., Santi, L. and Albin, A. (2000): Progress towards gene therapy for cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **19**, 261-270.
- Marshall, E. (1999): Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science*, **286**, 2244-2245.
- McCormick, F. (2001): Cancer gene therapy: fringe or cutting edge?. *Nat. Rev. Cancer*, **1**, 130-141.
- Mineta, T., Rabkin, S.D., Yazaki, T., Hunter, W.D. and Martuza, R.L. (1995): Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nature Med.*, **1**, 938-943.
- Moriuchi, S., Wolfe, D., Tamura, M., Yoshimine, T., Miura, F., Cohen, J.B. and Glorioso, J.C. (2002): Double suicide gene therapy using a replication defective herpes simplex virus vector reveals reciprocal interference in a malignant glioma model. *Gene Ther.*, **9**, 584-591.
- Moolten, F.L. (1986): Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: [aradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.*, **46**, 5276-5281.
- Nemunaitis, J., Swisher, S.G., Timmons, T., Connors, D., Mack, M., Doerksen, L., Weill, D., Wait, J., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., Fossella, F., Glisson, B.S., Hong, W.K., Khuri, F.R., Kurie, J.M., Lee, J.J., Lee, J.S., Nguyen, D.M., Nesbitt, J.C., Perez-Soler, R., Pisters, K.M., Putnam, J.B., Richli, W.R., Shin, D.M. and Walsh, G.L. (2000): Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Onc.*, **18**, 609-622.
- Nemunaitis, J., Khuri, F., Ganly, I., Arseneau, J., Posner, M., Vokes, E., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., Blackburn, A., Romel, L., Randlev, B., Kaye, S. and Kirn, D. (2001): Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J. Clin. Onc.*, **19**, 289-298.
- Nemunaitis, J. and O'Brien, J. (2002): Head and neck cancer: gene therapy approaches. Part II: genes delivered. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **2**, 311-324.
- Nishizaki, M., Meyn, R.E., Levy, L.B., Atkinson, E.N., White, R.A., Roth, J.A. and Ji, L. (2001): Synergistic inhibition of human lung cancer cell growth by adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in combination with docetaxel and radiation therapeutics *in vitro* and *in vivo*. *Clin. Cancer Res.*, **7**, 2887-2897.
- Pandha, H.S., Martin, L.A., Rigg, A., Hurst, H.C., Stamp, G.W., Sikora, K. and Lemoine, N.R. (1999): Genetic prodrug activation therapy for breast cancer: A phase I clinical trial of erbB-2-directed suicide gene expression. *J. Clin. Onc.*, **17**, 2180-2189.
- Petit, T., Davidson, K.K., Cerna, C., Lawrence, R.A., Von Hoff, D.D., Heise, C., Kirn, D. and Izbicka, E. (2002): Efficient induction of apoptosis by ONYX-015 adenovirus in human colon cancer cell lines regardless of p53 status. *Anti-cancer Drugs*, **13**, 47-50.
- Rahman, Z., Kavanagh, J., Champlin, R., Giles, R., Hanania, E., Fu, S., Zu, Z., Mehra, R., Holmes, F., Kudelka, A., Claxton, D., Verschraegen, C., Gajewski, J., Andreeff, M., Heimfeld, S., Berenson, R., Ellerson, D., Calvert, L., Mechetner, E., Holzmayer, T., Dayne, A., Hamer, J., Bachier, C., Ostrove, J. and Deisseroth, A. (1998): Chemotherapy immediately following autologous stem-cell transplantation in patients with advanced breast cancer. *Clinical Cancer Res.*, **4**, 2717-2721.
- Rainov, N.G., Fels, C., Droege, J.W., Schafer, C., Kramm, C.M. and Chou, T.C. (2001): Temozolomide enhances herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir therapy of malignant glioma. *Cancer Gene Ther.*, **8**, 662-668.
- Rodriguez, R., Schuur, E.R., Lim, H.Y., Henderson, G.A., Simons, J.W. and Henderson, D.R. (1997): Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res.*, **57**, 2559-2563.
- Schuler, M., Herrmann, R., De Greve, J.L., Stewart, A.K., Gatzemeier, U., Stewart, D.J., Laufman, L., Gralla, R., Kuball, J., Buhl, R., Heussel, C.P., Kommoss, F., Perruchoud, A.P., Shepherd, F.A., Fritz, M.A., Horowitz, J.A., Huber, C. and Rochlitz, C. (2001): Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients receiving chemo-

- therapy for advanced non-small-cell lung cancer: results of a multicenter phase II study. *J. Clin. Onc.*, **19**, 1750-1758.
- Seth, P., Brinkmann, U., Schwartz, G.N., Katayose, D., Gress, R., Pastan, I. and Cowan, K. (1996): Adenovirus-mediated gene transfer to human breast tumor cells: an approach for cancer gene therapy and bone marrow purging. *Cancer Res.*, **56**, 1346-1351.
- Shand, N., Weber, F., Mariani, L., Bernstein, M., Gianella-Boradori, A., Long, Z., Sorensen, A.G. and Barbier, N. (1999): A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI328 European-Canadian Study Group. *Human Gene Ther.*, **10**, 2325-2335.
- Swisher, S.G., Roth, J.A., Nemunaitis, J., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., Carrasco, C.H., Connors, D.G., El-Naggar, A.K., Fossella, F., Glisson B.S., Hong, W.K., Khuri, F.R., Kurie, J.M., Lee, J.J., Lee, J.S., Mack, M., Merritt, J.A., Nguyen, D.M., Nesbitt, J.C., Perez-Soler, R., Pisters, K.M., Putnam, B., Jr., Richli, W.R., Savin, M. and Waugh, M.K. (1999): Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J. National Cancer Institute*, **91**, 763-771.
- Touraine, R.L., Vahanian, N., Ramsey, W.J. and Blaese, R. M. (1998): Enhancement of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir bystander effect and its antitumor efficacy *in vivo* by pharmacologic manipulation of gap junctions. *Human Gene Ther.*, **9**, 2385-2391.