

ErbB 수용체를 이용한 난소암세포 표적 유전자치료 벡터의 개발

정인실* · 방성호*

한서대학교 생명과학과

Development of the Gene Therapy Vector for Targeting Ovarian Cancer Cells through ErbB Receptors

Insil Joung* and Seong Ho Bang*

Department of Biological Sciences, Hanseo University, Seosan 356-706, Republic of Korea

(Received March 11, 2011 / Accepted March 16, 2011)

Inefficiency of *in vivo* gene transfer using currently available vectors reflects a major hurdle in cancer gene therapy. Both viral and non-viral approaches have been described to improve gene transfer efficiency but suffer from a number of limitations. Here we tested an adenovirus carrying the small peptide ligand derived from heregulin β EGF-like domain onto fiber, the adenoviral capsid protein, to deliver transgene to ovarian cancer cells which overexpress ErbB, the cognate receptors for heregulin. The attachment of 53 amino acids to fiber didn't affect on the fiber's trimer structure that is critical for the viral entry to cells. The fiber-modified adenovirus can mediate entry and expression of a β -galactosidase into cancer cells in an increased efficiency compared the unmodified adenovirus. Particularly, the gene transfer efficiency was improved up to 5 times in OVCAR3 cells, an ovarian cancer cell line. Such transduction systems hold promise for delivering genes to ErbB receptor overexpressing cancer cells, and could be used for future cancer gene therapy.

Keywords: EGF-like domain, ErbB, gene therapy, ovarian cancer cells, redirecting-adenovirus

상피 난소암은 부인과 종양 중에서 가장 치명적인 암으로 한국과 서구 국가의 부인암 관련 사망원인 중 세 번째로 빈번하게 발생하지만(11, 17), 초기단계에서 진단이 어렵고 효율적인 치료법이 적은 악성 암이다(19). 그러나 난소암은 말기 상태에서도 대부분이 복강 내에 제한되어 진행되기 때문에 항암 치료제의 복강 내 주입과 같은 국부적 치료로 종양을 효율적으로 제거할 수 있는 가능성이 높다. 이 때문에 바이러스 벡터를 이용하여 종양특이 복제 바이러스, 자살유전자, 약물 전구체 등의 다양한 치료제를 국부적으로 전달함으로써 종양을 효율적으로 제거하려는 유전자치료법이 고안되고 있다(1, 16).

유전자치료에서 사용되는 바이러스 유전체 기반 벡터 중 아데노바이러스 벡터는 숙주의 다양성과 안정성, 바이러스 준비의 용이성과 같은 장점 때문에 많이 사용되고 있다(23). 그러나 아데노바이러스 벡터를 이용한 난소암 유전자치료의 임상시험은 임상단계에서 나타난 부작용으로 인해 조기 종료되

었다(24). 임상시험에서의 부작용 외에도 지금까지 유전자치료에 이용된 1세대 아데노바이러스 벡터는 유전자전달의 효율성에 문제가 제기된다. 종양의 감소 또는 퇴치를 목표로 하는 전통적인 유전자치료법에서 표적세포로의 유전자전달은 가장 중요한 요인이다. 따라서 유전자치료에서 유전자전달 매체의 비효율성은 유전자 주입 회수의 증가로 이어지고 이는 치료의 부작용 발생 가능성을 높이는 원인이 된다. 아데노바이러스의 세포 침투는 1차적으로 바이러스의 외피단백질 fiber와 세포 수용체인 CAR (Coxsackievirus B and adenovirus receptor)의 결합에 의해 일어나므로(2), 야생형의 fiber를 가지고 있는 1세대 아데노바이러스 벡터의 유전자전달 효율은 침입하는 세포에 발현하는 CAR의 양에 의존한다. 이런 면에서 CAR의 발현량이 적은 난소암 세포의 유전자치료에서(10, 25) 1세대 아데노바이러스를 이용한 유전자전달 효율은 높지 않을 것으로 예상된다.

이런 문제점을 해결하여 유전자전달의 효율성을 증대시키기 위하여 CAR의 발현과 관계없이 특정 세포로 표적하도록 고안된 개량 아데노바이러스 벡터의 개발이 활발히 진행되고

* For correspondence. (I. Joung) E-mail: ijoung@hanseo.ac.kr; Tel: +82-41-660-1341; Fax: +82-41-688-3403 / (S.H. Bang) E-mail: bang342@hanseo.ac.kr; Tel: +82-41-660-1342; Fax: +82-41-688-3403

있다(23). 우리는 아데노바이러스의 자연적인 감염경로에서 결정적인 역할을 하는 fiber와 CAR의 결합을 배제하고, 암세포에 과다발현하는 단백질을 통하여 바이러스가 감염되도록 외피단백질인 fiber에 특정 분자와 결합하는 리간드를 부착할 수 있도록 변형시킨 아데노바이러스 벡터 카세트를 개발하였다(14). 이번 연구에서는 이 카세트를 기반으로 하여 난소암세포에서 과다 발현되는 표면 분자를 표적할 수 있는 아데노바이러스 벡터를 제작하고 난소암에 특이적으로 유전자를 전달할 수 있는지를 검증하였다. 본고에서는 난소암에서 과다 발현되는 것으로 알려진 ErbB receptor family를 표적분자로 선택하고, 이 분자와 결합력이 높은 리간드인 heregulin β (HRG β)를 fiber에 부착하여 아데노바이러스의 자연수용체 발현여부에 영향을 받지 않고 난소암세포를 선택적으로 감염하는 아데노바이러스 벡터 전략의 타당성에 대해 기술하였다.

재료 및 방법

세포배양

293세포와 LN319, DM54MG, U373MG는 ATCC (American Type of Cell Collection, USA)와 서울대학교 세포주은행에서 각각 분양 받아, 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, USA), 100 u/ml penicillin/streptomycin을 첨가한 DMEM 배지(Life Technologies, USA)에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. MCF-7, SKOV3, OVCAR3 세포는 10% FBS, 100 u/ml penicillin/streptomycin이 첨가된 DMEM/F12 (50:50) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

H β E-AdLac의 제조와 확인

HRG β EGF like domain에서 ErbB3 receptor와 결합력이 높은 것으로 밝혀진 아미노산 172부터 232까지의 암호부위를 쥐 신경조직으로부터 RT-PCR을 이용하여 증폭하였다. 위의 염기서열을 갖는 cDNA를 아데노바이러스 C-말단에 특정 펩티드를 부착하도록 고안된 plasmid cassette에(14) 클론 한 후, pAdEasy1 vector (Stratagene, USA)의 야생형 fiber gene을 변형된 fiber cDNA로 대체하여 H β E-pAdEasy1 vector를 제작하였다. 제조사의 방법에 따라 p-H β E-AdEasy1 vector를 이용하여 reporter gene으로 *E. coli* β -galactosidase를 발현하는 재조합 아데노바이러스 H β E-AdLac을 제작하였다. 이 바이러스는 PCR과 Western blot 분석을 통해 확인하였다.

바이러스 배양 및 감염

야생형 fiber를 가진 AdLac과(15) 변형된 fiber를 가진 H β E-AdLac은 293 세포에서 증폭시키고 CsCl 밀도구배원심분리에 의해 정제한 후 -80°C에 보관하였다. 재조합 아데노바이러스는 293 세포에서 감염가(infectious unit)를 결정 한 다음 실험에 사용하였다. 세포의 종류에 따라 바이러스는 50부터 5,000 multiplicity of infection (MOI)로 2% FBS가 포함된 배지에서 2시간 동안 감염시키고 정상 배지로 갈아 준 다음 24시간 동안 배양하였다.

Western Blot 분석

AdLac과 H β E-AdLac을 MOI 5로 감염시킨 후 24시간 동안 배양한 HeLa 세포를 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 단백질 분해효소 억제제가 들어있는 용액에 넣고 4°C에서 10분간 반응시킨 후 10,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 세포 찌꺼기를 제거하였다. 세포용출 단백질 10 μ g을 환원조건[32.15 mM Tris-Cl; pH 6.8, 1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 50 mM Dithiothreitol (DTT), 10% glycerol]에서 가열하거나(reducing condition), 비환원조건(DTT를 제외하고 환원조건과 같은 용액)에서 가열하지 않고(nonreducing condition) 준비하여 9% SDS SDS-PAGE로 분획한 후, nitrocellulose membrane에 옮겨 fiber에 대한 4D2.5 항체와(7) 반응시켰으며 pico-enhanced chemiluminescence (Donjin Biotech, Korea)를 이용하여 확인하였다.

여러 종류의 암세포를 Lysis buffer (20 mM Tri-Cl; pH 7.5, 137 mM NaCl, 40 mM β -glycerophosphate, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 10 mg/ml aprotinin, leupeptin, pepstatin A, 1.0 mg/ml AEBSF)로 용출시킨 후, 10,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 세포 찌꺼기를 제거하였다. 각 세포에서 발현되는 ErbB2와 ErbB3의 양은 세포 용출 단백질 30 μ g을 8% SDS-PAGE로 분획하였으며, nitrocellulose membrane에 옮겨 anti-erbB2와 anti-erbB3 (모두 Santa Cruz, USA) 항체와 반응시킨 후, pico-enhanced chemiluminescence를 이용하여 확인하였다.

X-gal 염색

AdLac과 H β E-AdLac을 감염시켜 배양한 세포는 4°C의 0.25% glutaraldehyde 용액에서 10분 동안 고정시키고 생리식염수로 씻어준 다음 X-gal 염색용액[1 M Na₂HPO₄, 1 M NaH₂PO₄, 1 M MgCl₂, 20 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside (X-gal), 50 mM K₃Fe(CN)₆, 50 mM K₄Fe(CN)₆]을 넣은 후 37°C에서 밤새 반응시켰다.

β -Galactosidase 효소 활성 측정

바이러스를 감염시킨 암세포에 reporter lysis buffer (0.5% Triton X-100, 137 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5)를 첨가하여 용출시킨 후 상층액을 취하였다. 96 well plate 각 well에 상층액과 2 \times assay buffer (200 mM sodium phosphate pH 7.3, 2 mM MgCl₂, 100 mM β -mercaptoethanol, 8 mg/ml o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)를 50 μ l씩 넣고 37°C에서 30분 반응시킨 다음, 1 M Na₂CO₃ 100 μ l를 첨가하여 반응을 중지시키고, microplate reader를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상용의 β -galactosidase (Promega, USA)를 이용하여 작성한 표준곡선에 따라 각 시료의 활성을 결정하여 이를 단백질 1 μ g 당 milliumit로 나타내었다.

결과 및 고찰

난소암의 유전자치료에서 치료 유전자의 전달 효율을 증가

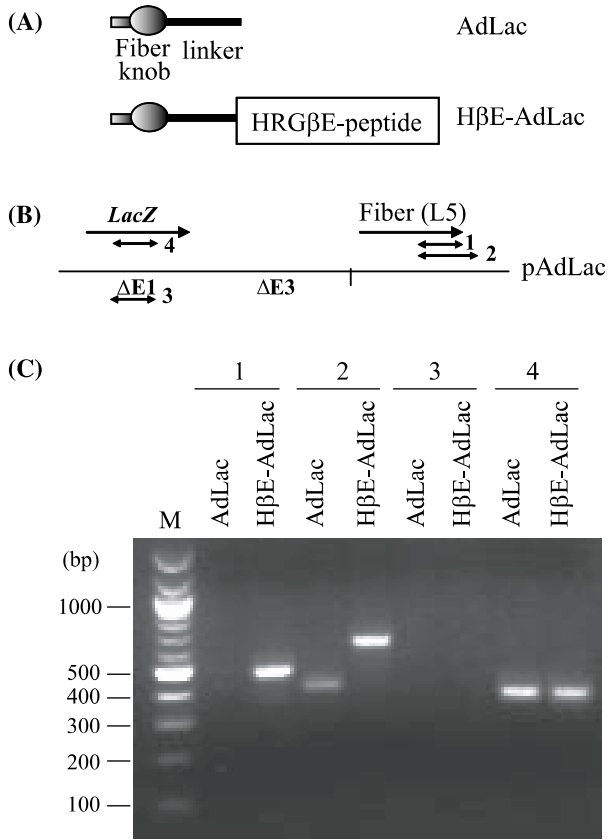


Fig. 1. Confirmation of HβE-LacZAd using PCR analysis. (A) Schematic diagram of recombinant adenovirus with HRGβ EGF-like domain attached to the C-terminus of fiber. (B) Location of PCR primers used to characterize virus stocks for the presence of the HRGβ EGF-like domain (1), for the presence of fiber (2), and for the presence of the β-galactosidase (*lacZ*) transgene (4) and for the absence of wild type Ad in virus stocks [by the absence of a PCR product specific for early region 1 (3)]. (C) PCR analysis of recombinant adenovirus DNA. Primers specific for the sequences were annealed to purified Ad DNA for Adlac or HβE-Adlac. The products and primers used are numbered as in panel B.

시킬 수 있는 전략으로 선택적 유전자전달 능력이 향상된 아데노바이러스를 제작하였다. 기존 1세대 아데노바이러스를 통한 유전자전달의 비효율성을 줄이고 난소암세포로의 선택적 유전자전달 효율을 높이기 위해 세포 수용체 CAR와 결합하여 아데노바이러스가 세포에 침투할 때 주된 역할을 하는 바이러스 외피단백질 fiber (2)를 변형시켰다(Fig. 1A).

ErbB receptor family는 악성종양의 형성에 중요한 역할을 하며 많은 종양세포에 과다 발현되어 있으므로 암의 진단이나 치료를 위한 표적 분자로 이용되고 있다(9). 이 중 ErbB2와 ErbB3 receptor는 난소암세포에서 그 발현이 증가되는 것으로 보고되었으며, 이를 난소암의 진단과 치료의 표적분자로 이용하려는 시도가 이루어지고 있다(5-6, 8, 18, 20-22). ErbB2와 EbrB3에 결합하는 ligand 중 Neuregulin-1 (NRG-1), 또는

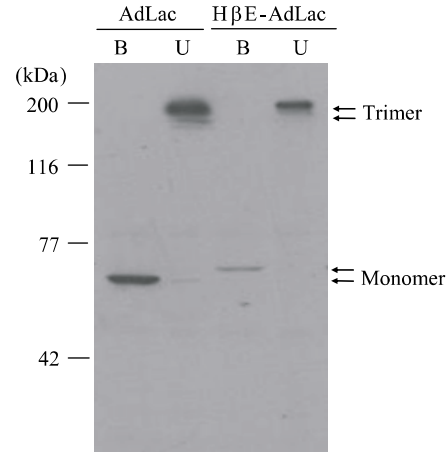


Fig. 2. Trimer formation by fiber expressing constructs. Boiled (B) and unboiled (U) lysates from cells infected with either AdLac or HβE-AdLac were separated by size and blotted, as described in 'Materials and Methods'. The blot was developed with mAb against the fiber, 4D2.5. The positions expected for monomers and trimers are indicated with arrows. Monomer and trimer forms of the fiber in HβE-AdLac are slightly larger in molecular mass, due to the presence of the linker and HRGβ EGF-like domain.

Heregulin (HRGs)은 하나의 유전자에서부터 선택적 mRNA splicing에 의해 다양한 isoform이 만들어진다. 모든 HRG isoform은 EGF-like domain을 갖고 있는데 이 부위만으로 ErbB receptor와 결합할 수 있다(3). 따라서 이와 같이 난소암 세포에 과다 발현하는 ErbB2, ErbB3 receptor와 그 ligand인 NRG-1 사이의 결합력을 바탕으로 종양세포로 표적되는 유전자전달 system을 고안하였다. *In vitro* binding system을 이용하여 ErbB receptor와 EGF를 포함한 여러 NRG-1 isotype에 있는 EGF-like domain간의 결합력을 측정 한 일련의 연구결과에 따르면 ErbB3 receptor에 대해 HRGβ의 EGF domain이 가장 강하게 결합하는 것으로 밝혀졌다(12, 13).

이번 연구에서는 HRGβ의 전체 EGF-like domain과 비슷한 결합력으로 ErbB3 receptor와 결합하는 것으로 알려진 HRGβ의 EGF-like domain 중 53개의 아미노산(HRGβ의 amino acid 177부터 229)만을 fiber에 부착시켰다. 변형된 Fiber를 가진 재조합아데노바이러스의 유전자전달 효율을 측정하기 위해 reporter gene으로 β-galactosidase를 발현하는 재조합아데노바이러스 HβE-AdLac을 제작하였다. 이 바이러스를 부위 특이적 primer를 이용한 PCR로 조사하였을 때, HRGβ EGF-like domain이 부착되어 야생형 fiber보다 크기가 큰 변형 fiber 유전자를 확인하였다(Fig. 1C).

아데노바이러스 외피단백질 fiber는 trimer 구조를 형성하며 이 구조가 바이러스의 세포 침투에 중요한 역할을 한다. HRGβ의 EGF-like domain이 부착된 변형된 fiber가 세포 감염에 필수적인 trimer 구조를 형성하는지 확인하기 위하여 야생형 fiber를 가진 AdLac과 변형된 fiber를 가진 HβE-AdLac을 감염시킨 HeLa 세포를 이용하여 Fiber의 구조를 조사하였다(Fig. 2).

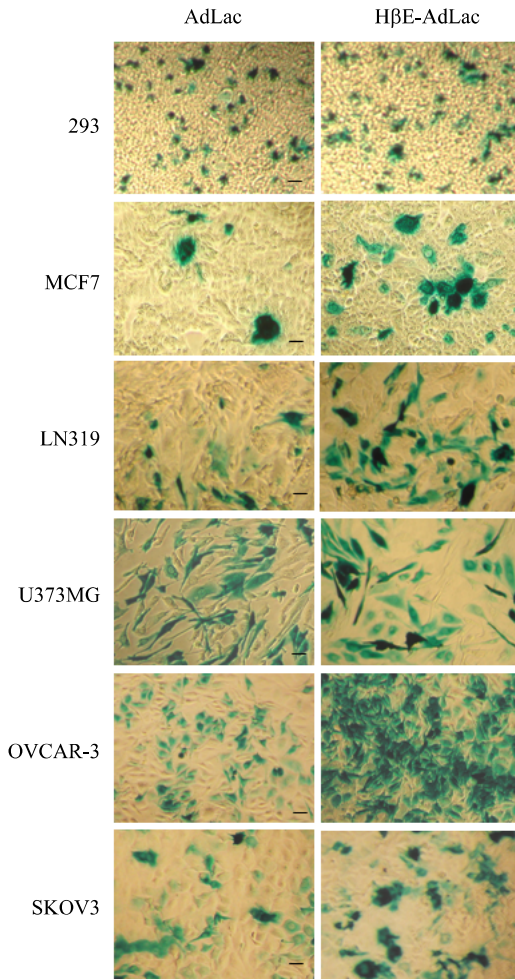


Fig. 3. Virus mediated transduction of β -galctosidase in various cancer cells detected by X-gal staining. Cells infected with AdLac or H β E-AdLac in a 24 well plate were stained with X-gal and images were captured on Axioskop microscope (Carl Zeiss, Germany). Expression of β -galctosidase was shown in dark stained cells. MOIs used in this experiment were 50 for 293, 5000 for MCF7, and 1000 for LN319, U373MG, OVCAR3, SKOV3, respectively. Scale bars, 25 μ m.

환원조건에서 수행한 Western Blot 분석에서 H β E-AdLac의 fiber는 AdLac의 야생형 Fiber보다 크기가 크게 나타났다. 이는 fiber에 부착된 EGF-like domain의 크기만큼의 차이를 나타내며 PCR 분석의 결과와 일치한다. 비환원조건에서 수행한 Western Blot 분석에서 H β E-AdLac은 야생형 fiber와 마찬가지로 trimer 구조를 형성하는 것을 알 수 있었다. 따라서 fiber에 부착된 HRG β EGF-like domain이 fiber의 3차 구조 형성에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다.

H β E-AdLac이 난소암 특이적으로 유전자전달을 하는지 측정하기 위해 난소암 세포주를 포함한 다양한 종류의 암세포주에서 바이러스에 의한 β -galactosidase 발현을 X-gal 염색법으

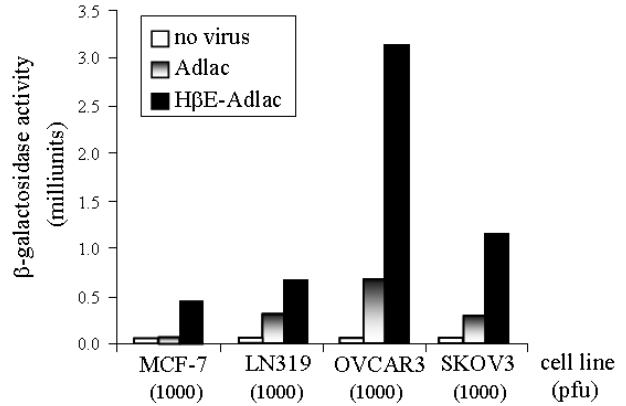


Fig. 4. Virus-mediated transduction of β -galactosidase activity into various cancer cells measured by enzyme assay. Cells were infected with AdLac or H β E-AdLac at MOI indicated as pfu. β -Galactosidase activity measured by enzyme assay and enzyme activities are expressed as miliunits according to manufacturer's instruction (Promega, USA). Data shown represent the average of three independent experiments.

로 측정하였다(Fig. 3). 293 세포에서는 AdLac과 H β E-AdLac의 유전자전달 효율이 크게 차이가 나지 않았다. 이는 ErbB receptor의 발현이 적은 293 세포에서 fiber-CAR의 특이적 결합이 아닌 fiber의 RGD domain과 세포의 integrin과의 결합 경로를 통해 바이러스가 침투하는 것으로 보인다(2). 유방암세포주인 MCF7과 뇌종양세포주인 LN319에서 H β E-AdLac에 의한 β -galactosidase 유전자전달이 AdLac에 비해 약간 증가하였으나 또 다른 뇌종양 세포주 U373MG에서는 큰 차이를 확인할 수 없었다. 그러나 난소암세포주인 OVCAR3와 SKOV3에서는 H β E-AdLac이 야생형 fiber를 가진 AdLac에 비해 유전자를 훨씬 잘 전달하는 것을 알 수 있었다. 다음으로 β -galactosidase 효소활성 측정을 이용하여 fiber가 변형된 바이러스에 의한 유전자전달 효율이 야생형 fiber를 가진 1세대 바이러스에 비해 얼마나 향상되었는가를 정량적으로 조사하였다(Fig. 4). 같은 양의 바이러스를 세포에 감염시켰을 때 H β E-AdLac은 유방암세포주 MCF7이나 뇌종양세포주 LN319에 비해 난소암세포주인 OVCAR3와 SKOV3로 유전자를 더 효율적으로 전달하는 것을 확인하였다. 특히 OVCAR3 세포주에서는 야생형 fiber를 가진 AdLac에 비해 H β E-AdLac에 의한 유전자전달 효율이 약 5배 증가하였다.

다른 종류의 종양세포보다 난소암세포로의 H β E-AdLac에 의한 유전자전달 효율이 우수한 이유는 아테노바이러스의 외피 단백질인 fiber에 부착한 HRG β -EGF like domain이 ErbB receptor에 결합함으로써 바이러스를 세포로 유도하기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 H β E-AdLac에 유전자전달이 fiber에 부착한 HRG β EGF-like domain에 의해 매개되는지를 알아보기 위하여 각 세포주에 발현하는 ErbB2와 ErbB3 receptor의 양을 조사하였다(Fig. 5). 다른 세포주에 비해 난소암세포주인 OVCAR3와 SKOV3에서 ErbB2 발현이 현저히 높은 것을 알

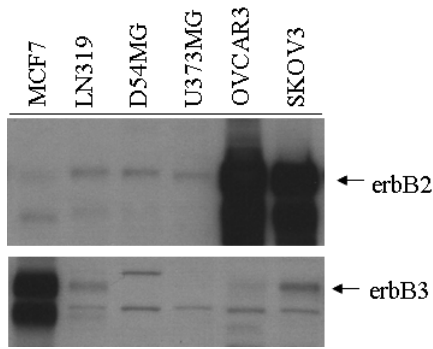


Fig. 5. Relative amounts of ErbB2 and ErbB3 receptors as determined by Western blotting. Same amounts of total proteins (30 µg) from each cell line were used for the analysis as described in ‘Materials and Methods’.

수 있었고 이런 표적분자의 과다발현이 HβE-AdLac에 의한 유전자를 전달 효율 증가의 원인이 되는 것으로 추측된다.

ErbB receptor family는 구조적으로 비슷한 ErbB1-4의 4개의 receptor로 구성되어 있으며 이들은 동형(homodimer) 또는 이형이량체(heterodimer)를 형성하여 세포 내로 다양한 신호를 전달한다. 이 중 ErbB1, ErbB3, ErbB4는 각기 다른 ligand에 결합하며, ErbB2는 특정 ligand와 결합하지 않지만 ligand에 결합한 다른 ErbB receptor와 일차적으로 이량체를 형성한다(4). 지금까지 알려진 모든 HRG isoform은 ErbB3와 B4에만 특이적으로 결합하여 ErbB2/B3, ErbB2/B4의 이형이량체나 ErbB4/B4의 이형이량체를 형성하는 것으로 알려졌다. ErbB3 receptor의 발현이 현저히 증가되어 있는 유방암세포주 MCF7에서도 HβE-AdLac에 의한 유전자전달은 AdLac에 비해 증가하였으나 전체적인 유전자전달 효율은 떨어졌다(Fig. 4). 이는 HβE-AdLac 외피에 위치한 HRGβ EGF-like domain이 ErbB3에 특이적으로 결합한 후 ErbB2/B3 이형이량체를 형성할 때 바이러스의 세포 내 침투가 증가될 것으로 추측할 수 있다. 따라서 ErbB3 외에 ErbB2 receptor가 과다발현된 세포에 HβE-AdLac 바이러스의 유전자전달효율이 증가하는 것으로 생각된다.

상피 난소암은 초기단계에서 진단이 어렵고 효율적인 치료법이 적은 악성암이다(19). 그러나 난소암은 말기 상태에서도 대부분이 복강 내에 제한되어 진행되기 때문에 항암치료제의 복강 내 주입과 같은 국부적 치료로 종양을 효율적으로 제거할 수 있는 가능성이 높다. 이번 연구에서는 난소암세포에 과다 발현되는 것으로 알려진 ErbB2, ErbB3 receptor를 목표로 하여 이와 결합할 수 있는 최소 부위인 EGF domain 중 53개 아미노산으로 구성된 암세포 표적 ligand를 바이러스 외피에 부착한 재조합 아데노바이러스 벡터를 개발하였다. 이 벡터를 이용할 때 난소암세포주로 외래 유전자를 선택적이고 효율적으로 전달할 수 있는 것을 확인하였다. 따라서 이번 연구에서 개발된 아데노바이러스에 살상 유전자 발현하도록 조작하면 난소암을 선택적으로 죽임으로써 효율적인 난소암 치료효과를

기대할 수 있는 바이러스 벡터를 개발을 할 수 있을 것으로 생각된다.

적요

암의 유전자치료에서 암세포로의 선택적 유전자전달 매체의 부족은 치료효과의 감소를 야기하는 문제이다. 본 연구에서는 난소암 유전자치료의 효율을 높이기 위한 목적으로 난소암세포로 선택적인 유전자전달을 하도록 개량된 아데노바이러스 벡터를 제조하고, 그 효율성을 난소암세포주를 이용하여 조사하였다. 난소암세포에 과다발현하는 분자인 ErbB receptor를 표적하도록 아데노바이러스 외피단백질 fiber에 ErbB receptor에 대한 ligand인 heregulin으로부터 유래한 펩티드를 부착하였다. 53개의 아미노산으로 구성된 외부 펩티드를 fiber에 부착하였을 때 바이러스 감염에 중요한 기능을 하는 fiber 삼량체 구조 형성에 영향을 미치지 않았다. Fiber를 조작한 개량 아데노바이러스는 야생형 fiber를 가진 1세대 아데노바이러스 벡터에 비해 선택적으로 난소암으로 유전자를 전달하는 비율이 증가하였다. 특히 항암제에 저항성을 가진 난소암세포주 OVCAR3에서 유전자전달 효율이 약 5배 증가되었다. 따라서 난소암의 유전자치료에서 개량된 아데노바이러스로 치료 유전자를 전달하면 치료의 효율성을 향상시킬 수 있을 것이다.

감사의 말

이 연구는 2007년도 한서대학교 교비학술연구 지원사업에 의해 수행되었음(정인실).

참고문헌

- Alvarez, R.D., J. Gomez-Navarro, M. Wang, M.N. Barnes, T.V. Strong, R.B. Arani, W. Arafat, J.V. Hughes, G.P. Seigal, and D.T. Curiel. 2000. Adenoviral-mediated suicide gene therapy for ovarian cancer. *Mol. Ther.* 2, 524-530.
- Bergelson, J.M., A. Krithivas, L. Celi, G. Droguett, M.S. Horwitz, T. Wickham, R.L. Crowell, and R.W. Finberg. 1998. The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J. Virol.* 72, 415-419.
- Birchmeier, C. and K.A. Nave. 2008. Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia* 56, 1491-1497.
- Bubill, E.M. and Y. Yarden. 2007. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 19, 124-134.
- Chen, W., R. Bardhan, M. Bartels, C. Perez-Torres, R. Pautler, N. Halas, and A. Joshi. 2010. A molecularly targeted theranostic probe for ovarian cancer. *Mol. Cancer Ther.* 9, 1028-1038.
- Dimova, I., B. Zaharieva, S. Raitcheva, R. Dimitrov, N. Doganov, and D. Toncheva. 2006. Tissue microarray analysis of EGFR and erbB2 copy number changes in ovarian tumors. *Int. J. Gynecol. Cancer* 16, 145-151.
- Hong, J.S. and J.A. Engler. 1991. The amino terminus of the adenovirus fiber protein encodes the nuclear localization signal. *Virol.* 185, 758-767.

8. Høgdall, E.V., L. Christensen, K.S. Kjaer, J. Blaakaer, J.E. Bock, E. Glud, B. Nørgaard-Pedersen, and C.K. Høgdall. 2003. Distribution of HER-2 overexpression in ovarian carcinoma tissue and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma. *Cancer Cell* 98, 66-73.
9. Hynes, N.E. and H. Lane. 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 5, 341-354.
10. Ingram, N., L.P. MacCormac, N.T. Oxley, P.A. Burns, and G.D. Hall. 2010. Role of cell surface molecules and autologous ascitic fluid in determining efficiency of adenoviral transduction of ovarian cancer cells. *Cancer Gene Ther.* 17, 684-693.
11. Jemal, A., R. Siegel, J. Xu, and E. Ward. 2010. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J. Clin.* 60, 277-300.
12. Jones, J.T., R.W. Akita, and M.X. Sliwkowski. 1999. Binding specificities and affinities of *egf* domains for ErbB receptors. *FEBS Lett.* 447, 227-231.
13. Jones, J.T., M.D. Ballinger, P.I. Pisacane, J.A. Lofgren, V.D. Fitzpatrick, W.J. Fairbrother, J.A. Wells, and M.X. Sliwkowski. 1998. Binding interaction of the heregulinβ *egf* domain with ErbB3 and ErbB4 receptors assessed by alanine scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 273, 11667-11674.
14. Joung, I., G. Harber, K.M. Gerecke, S.L. Carroll, J.F. Collawn, and J.A. Engler. 2005. Improved gene delivery into neuroglial cells using a fiber-modified adenovirus vector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 1182-1187.
15. Joung, I., H.S. Kim, J.S. Hong, H. Kwon, and Y.K. Kwon. 2000. Effective gene transfer into regeneration sciatic nerves by adenoviral vector: Potentials for gene therapy of peripheral nerve injury. *Mol. Cells* 10, 540-545.
16. Kim, J., E.S. Hwang, J.S. Kim, E. You, S.H. Lee, and J. Lee. 1999. Intraperitoneal gene therapy with adenoviral-mediated p53 tumor suppressor gene for ovarian cancer model in nude mouse FREE. *Cancer Gene Ther.* 6, 172-178.
17. Korean Cancer database center. 2007. Death rate cause by cancers among Korean. Cancer Statistics.
18. Lee, B.C., K. Cha, S. Avraham, and H.K. Avraham. 2004. Microarray analysis of differentially expressed genes associated with human ovarian cancer. *Int. J. Oncol.* 24, 847-851.
19. McGuire, W.P. and M. Markman. 2003. Primary ovarian cancer chemotherapy: Current standards of care. *Br. J. Cancer* 89, 3-8.
20. Morrison, J., S.S. Briggs, N.K. Green, C. Thoma, K.D. Fisher, S. Kehoe, and L.W. Seymour. 2009. Cetuximab retargeting of adenovirus via the epidermal growth factor receptor for treatment of intraperitoneal ovarian cancer. *Human Gene Ther.* 20, 239-251.
21. Motoyama, A.B., N.E. Hynes, and H.A. Lane. 2002. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the ability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res.* 62, 3151-3158.
22. Tanner, B., D. Hasenclever, K. Stern, W. Schormann, M. Bezler, M. Hermes, M. Brulport, A. Bauer, I.B. Schiffer, S. Gebhard, and *et al.* 2006. ErbB-3 predicts survival in ovarian cancer. *J. Clin. Oncol.* 24, 4317-4323.
23. Wickham, T.J. 2000. Targeting adenovirus. *Gene Ther.* 7, 110-114.
24. Zeimet, A.G. and C. Marth. 2003. Why did p53 gene therapy fail in ovarian cancer? *Lancet Oncol.* 4, 415-422.
25. Zeimet, A.G., E. Müller-Holzner, A. Schuler, G. Hartung, J. Berger, M. Hermann, M. Widschwendter, J.M. Bergelson, and C. Marth. 2002. Determination of molecules regulating gene delivery using adenoviral vectors in ovarian carcinomas. *Gene Ther.* 9, 1093-1100.