

Development of a Gene Therapy Method for Cervical Cancer Using Attenuated Coxsackievirus B3 as a Vector System

Seung-Hyun Shim[†], Yeon-Jung Kim[†], Dae-Sun Kim and Jae-Hwan Nam^{*}

Department of Biotechnology, The Catholic University, Gyeonggi-do, Korea

We previously reported the development of an attenuated coxsackievirus B3, known as YYFF, which functioned as a viral vector system for foreign gene expression. In this study, we demonstrated the potential use of YYFF as a gene therapy vector. Recombinant YYFF was constructed to express the human papillomavirus 16 (HPV16) E7 gene, referred to as YYFF-HPV16-E7. Growth of YYFF-HPV16-E7 resembled the wild type, YYFF, and it expressed HPV16-E7 in cell culture. When YYFF-HPV16-E7 was directly injected into TC-1-transplanted C57/BL6 mice, there was no reduction in tumor size, because of the non-growth of YYFF in C57/BL6 mice. However, when YYFF-HPV16-E7-induced immune cells/serum that originated from BALB/c mice was passively delivered into BALB/c background TC-1-transplanted nude mice, it reduced the size of cervical tumors in the nude mice. This study indicates the potential use of YYFF-HPV16-E7 as a gene therapy agent for treating HPV-induced cervical cancer.

Key Words: Attenuated coxsackievirus B3, YYFF, Gene therapy, Vector system, Cervical cancer

서 론

백신 연구는 특정 병원체에 대한 memory B cells의 준비를 목적으로 하는 예방용 백신의 개발과 병원체가 감염된 숙주 세포의 제거를 목적으로 하는 치료용 백신의 개발로 나누어 질 수 있다 (1). 예방이나 치료를 목적으로 인체 내의 면역 반응을 유도하기 위해서는 적절한 항원이 필요하다. 따라서 최근의 백신 연구는 이러한 목적을 위해 병원성을 조절할 수 있는 항원을 발견하고 이를 활용하는데 초점을 맞추고 있으며, 이러한 새로운 백신은

기능이 확인된 항원을 독성 없이 인체 내에 전달하여 치료 및 예방용 백신으로 사용할 수 있을 것으로 기대된다 (2). 특히 치료용 백신으로의 목적을 달성하기 위해서는 항원을 적절하게 인체 내로 전달할 수 있는 전달 방법이 필요하다. 따라서 최근 다양한 벡터 시스템을 활용하여 적절한 항원을 원하는 곳에 전달하여 발현시킬 수 있는 전달 시스템을 개발하는 연구가 활발하게 진행되고 있다 (3).

항원 유전자의 전달 및 발현 벡터에는 크게 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터로 나뉘게 된다 (4). 비바이러스성 벡터는 DNA를 직접 주사하는 방법을 포함하여 바이러스 이외에 다른 고분자 등을 이용하여 전달하는 벡터이다. 이 방법은 낮은 유전자 전달 효율과 짧은 발현 기간 등의 단점이 있지만, 임상적으로는 상대적으로 안전하다는 장점을 가지고 있다. 바이러스성 벡터는 병원성이 없는 바이러스에 원하는 유전자를 발현하는 재조합 바이러스를 제작하고 목표로 하는 세포에 특이적으로 감염시키거나 염색체 내로 안정적으로 삽입시킬 수 있는 장점을 가지고 있다. 또한 비바이러스성 벡터에 비해 매우 높은 유전자 전달 효율을 가지고 있기 때문에 현재 임

Received: April 13, 2011/ Revised: May 30, 2011

Accepted: June 8, 2011

[†]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author: Jae-Hwan Nam, Ph.D. Department of Biotechnology, The Catholic University of Korea, 43-1 Yeoksok 2-dong, Wonmi-gu, Bucheon, Gyeonggi-do, 420-743, Korea.

Phone: +82-2-2164-4852, Fax: +82-2-2164-4917

e-mail: jhnam@catholic.ac.kr

^{**}This study was supported by a grant from GRRC of the Catholic University of Korea, the Next-generation Biogreen21 Program (PJ007186) of Rural Development of Administration, MKE and KOTEF through the Human Resource Training Project for Strategic Technology.

상적으로 적용된 대부분의 유전자 치료 연구는 모두 바이러스성 벡터를 사용하여 이루어져 왔다 (5). 바이러스성 벡터는 현재 Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV)를 이용한 레트로바이러스 (Retrovirus), 아데노바이러스 (Adenovirus), 아데노부속바이러스 (Adeno-associated Virus), 단순포진바이러스 (Herpes Simplex Virus), 포스바이러스 (Poxvirus), 렌티바이러스 (Lentivirus) 등이 연구되거나 임상시험 중에 있다 (6). 이러한 바이러스성 벡터의 큰 특징은 그 바이러스 자체의 특성을 활용하여 *in vivo* 동물 모델의 장기에 전달하는 것이다. 즉 바이러스마다 감염되는 조직도 다르고 자신이 가진 유전자를 숙주 세포에 전달 및 유지하는 방식도 다르다. 이러한 이유로 한 종류의 바이러스 벡터가 다양한 질환에 적용되기는 어렵다. 그렇게 때문에 여러 가지 상황에 적절하게 이용될 수 있는 다양한 바이러스 벡터의 개발이 필요하다. 본 연구에서는 엔테로바이러스 계열인 coxsackievirus B3 (CVB3)를 약독화 시킨 바이러스를 이용하여 유전자 치료에 활용할 수 있는 바이러스성 벡터로서의 사용 가능성과 효과에 대해 알아보고자 한다. 이를 위해 모델 시스템으로는 human papillomavirus (HPV)에 의해 유래된 자궁경부암 모델을 활용하였으며 CVB3는 HPV16-E7 유전자를 발현하도록 제작하였다.

Coxsackievirus는 Picornaviridae 과(family)의 enterovirus 속(genus)에 속하며 약 7,400 bp의 크기의 양성 단일가닥 (positive sense single-strand) RNA를 갖는 바이러스이다. Coxsackievirus에는 여러 종류가 있지만 본 연구에서 사용한 CVB3는 바이러스 심근염(viral myocarditis)을 유발하는 바이러스로 잘 알려져 있다 (7). CVB3는 숙주 세포에 감염된 후 11개의 단백질을 생성하는데 그 중 VP1, VP2, VP3, VP4는 바이러스의 구조를 유지하는 캡시드(capsid) 단백질이다. 본 연구진은 이미 CVB3의 VP2 부위에 면역 세포 활성화와 관련된 ITAM (immunoreceptor tyrosine activation motif) 부위로 추정되는 부분을 발견하였다. VP2 부분에 존재하는 두 개의 tyrosine을 phenylalanine으로 교체하여 약독화된 coxsackievirus B3를 개발하였고 이를 YYFF로 명명하였다 (8). 또한 본 연구진은 YYFF를 외부 유전자 발현 벡터 시스템으로 활용 가능한지를 확인하기 위해 reporter 유전자로 renilla 유전자를 발현하여 감염된 마우스의 다양한 장기에서 외부 유전자 발현 효율이 높은 것을 확인하였다 (9). 이외에도 hepatitis C virus (HCV) E2 유전자를 발현시켜 바이러스에 삽입한 외부

유전자에 대한 항체 생성 역시 가능성을 *in vivo*에서 확인하였다 (10). 이는 본 연구진이 개발한 YYFF가 *in vivo*에서 외부 유전자를 잘 발현시킬 수 있으며, 따라서 예방용 백신 벡터로 활용할 가능성이 충분함을 보여주고 있다.

본 연구에서는 예방용 백신 벡터로서의 가능성이 확인된 YYFF가 유전자 치료용 벡터로도 가능한지를 확인하기 위해 HPV16의 발암유전자로 잘 알려져 있는 E6과 E7 중, E7을 YYFF 바이러스에 삽입하였다. E7은 종양억제 유전자인 p53의 작용을 방해하여 암을 유발하는 것으로 알려져 있다 (11). 본 연구에서 개발된 HPV16-E7을 발현하는 재조합 YYFF는 mouse에서 E7에 대한 면역 반응을 유도하고 E7에 대한 특이적 면역 반응은 HPV16-E7 유전자를 세포 표면에 제시하는 자궁경부암 세포를 공격하여 제거할 것으로 기대된다.

재료 및 방법

HPV16-E7을 발현하는 재조합 YYFF 제작

본 연구에서 벡터 시스템으로 사용한 바이러스는 coxsackievirus B3 (CVB3, woodruff strain)의 VP2 region에서 발견된 ITAM이라 추정되는 부분에 존재하는 두 개의 tyrosine을 phenylalanine으로 point mutation 시킨 바이러스인 YYFF를 사용하였다. 이전 연구에서 제작한 재조합 YYFF와 동일하게 VP4 앞에 HPV16 바이러스의 E7 서열을 삽입하였다(Fig. 1) (10). 제작된 재조합 바이러스는 YYFF-HPV16-E7으로 명명하였다. YYFF와 YYFF-HPV16-E7 모두 HeLa 세포에서 증식시켰다. 종양 형성에 사용된 TC-1은 E7을 지속적으로 발현하는 mouse 상피 세포주이다 (12). 두 세포 모두 10% fetal bovine serum (FBS), 10,000 unit/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다.

Plaque assay

시간대 별로 바이러스에 감염된 세포와 배양액을 따로 microcentrifuge tube에 넣고 freezing & thawing을 3회 실시하였다. 그 후 이 샘플들을 10배씩 희석하여 HeLa 세포가 배양된 6 well plate에 100 µl씩 넣었다. 1시간 동안 반응시킨 뒤 1% agarose, 0.4% FBS가 포함된 DMEM 배지를 넣었다. 36시간 뒤 plaque이 형성되면 fixation 후

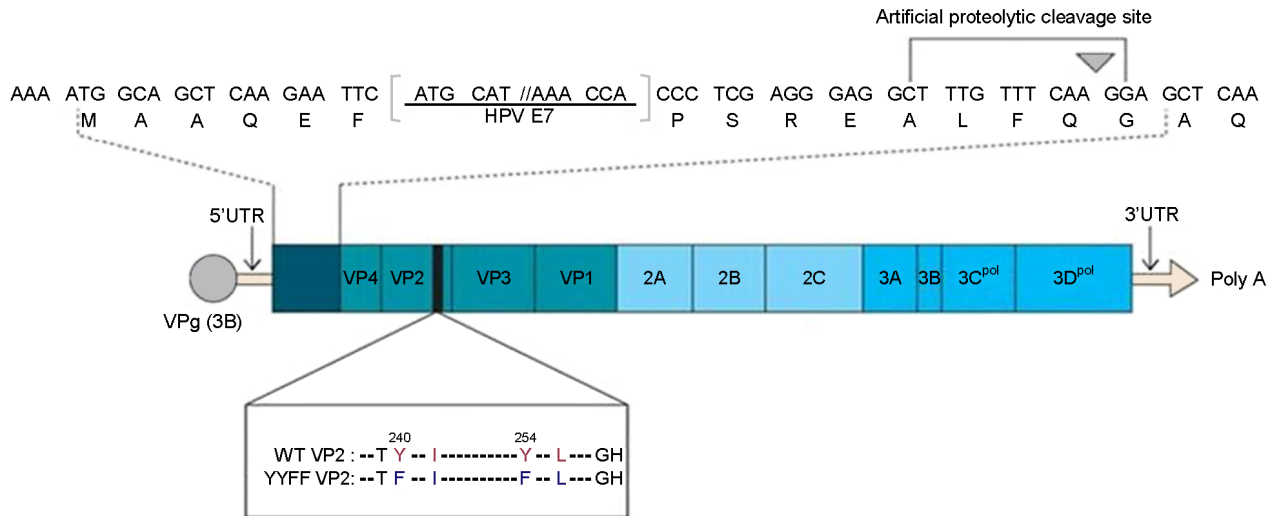


Figure 1. Construction of recombinant coxsackievirus expressing HPV16 E7 flanked by viral protein 4 (VP4). The black box in viral protein 2 (VP2) indicates the conserved amino acid sequence in the C-terminal region of the VP2 protein of coxsackievirus B3 (CVB3). The VP2 protein contains tyrosines at positions 240 and 254 in the wild-type CVB3 (WT), whereas both tyrosines are replaced by phenylalanine in YYFF VP2.

crystal violet 용액으로 염색하여 plaque의 개수를 확인하여 바이러스 역가를 확인하였다.

RNA 추출 및 reverse transcriptional PCR

HeLa 세포에 YYFF, YYFF-HPV16-E7을 감염시킨 뒤 TRIzol 시약(Takara, Seoul, Korea)으로 세포를 깬 후 chloroform을 첨가한다. 원심분리 후에 RNA가 포함된 상층액을 새로운 microcentrifuge tube에 옮기고 isopropyl alcohol을 첨가하여 상온에 10분간 두었다가 원심분리 하였다. RNA 침전물을 제외한 상층액을 제거하고 75% 에탄올을 첨가한 뒤 원심분리 하였다. 이 후 침전물을 제외한 상층액을 제거하고 공기 중에서 건조시킨 뒤 RNase와 DNase가 포함되어 있지 않은 증류수로 RNA를 녹이고 정량하였다. 1 µg의 RNA에 oligo-dT primer를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 역전사 반응의 결과로 만들어진 cDNA를 E7에 특이적인 primer set(아래 참조)를 이용하여 증폭하였다. PCR 결과물은 1% agarose gel로 전기영동하여 확인하였다.

HPV16-E7 sense:

5' - GTCCGAATTATGCATGGAGATACACCTACATTG - 3'

HPV16-E7 anti-sense:

5' - CTCTCTCGAGGGTGGTTTCTGAGAACAGATGGG - 3'

Immunofluorescent assay (IFA)

6 well plate 안의 cover-glass 위에 HeLa 세포를 배양한 뒤, YYFF와 YYFF-HPV16-E7을 감염시켰다. Cytopathic effect (CPE)를 확인한 후 methyl alcohol과 acetone을 3:1로 섞은 fixer 용액 2 ml로 10분간 고정시킨 뒤 상온에서 건조시켰다. HPV-E7 monoclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 1:50으로 2시간 동안 반응시킨 뒤 PBS로 3회 세척하였다. Mouse IgG antibody-FITC를 2시간 동안 암실에서 반응시킨 후 표본 제작하여 형광 현미경(OLYMPUS, Seoul, Korea)으로 관찰하였다.

Western blot

각 20 µg의 단백질을 sodium dodecyl sulfate (SDS)가 포함된 10% polyacrylamide gel을 이용하여 stacking gel은 60 V, running gel은 80 V로 전기영동 하였다. 전기영동 후 nitrocellulose membrane (Whatman, Dassel, Germany)에 단백질을 transfer 한 후, 일차항체는 anti-VP1 (Novocastra Laboratories, Newcastle, United Kingdom), α-tubulin (Lab frontier, Anyang, Korea), anti-HPV-E7 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)을 각각 1:2,000의 비율로 희석하여 16시간 동안 4°C에서 반응시켰으며, 이차항체로 동일한 비율의 anti-mouse IgG-HRP (Assay Designs, MI, USA)과

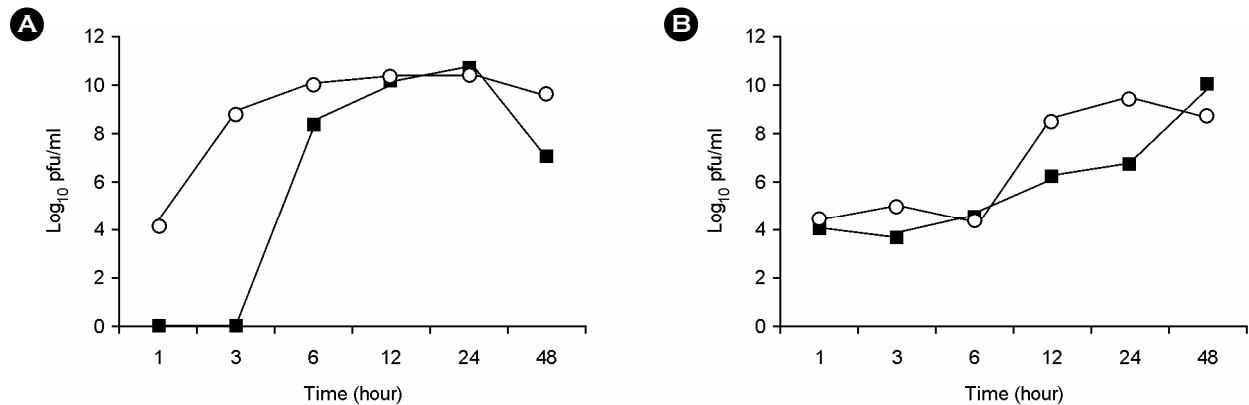


Figure 2. The growth of the viruses YYFF and YYFF-HPV16-E7 in HeLa cells (MOI = 10). (A) Intracellular viral titer. (B) Extracellular viral titer at each time point as determined by plaque assay (described in Materials and Methods). YYFF (○) and YYFF-HPV16-E7 (■).

anti-rabbit IgG-HRP (Assay Designs, MI, USA)를 1시간 동안 반응시켰다.

동물 실험 및 passive immune 실험

실험에 사용된 mouse는 C57/BL6, BALB/c, BALB/c nude mouse를 오리엔트(주) (Seongnam, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 종양을 형성하기 위하여 C57/BL6, BALB/c nude mouse에 TC-1 세포를 5×10^6 cell/200 μ l의 양으로 subcutaneous (SC)로 옆구리 부분에 주사기로 이식하였다. C57/BL6에는 바이러스를 1×10^6 pfu/ml의 양으로 intraperitoneal (IP)로 mouse에 접종하였다. BALB/c nude mouse에는 BALB/c mouse에 바이러스를 1×10^6 pfu/ml의 양으로 감염시킨 뒤 8일 후 수확한 면역 세포(5×10^5 cell/100 μ l) 및 혈청(100 μ l)을 intravenous (IV)로 3일간격으로 3회 접종하였다.

결 과

YYFF-HPV16-E7 성장 곡선

바이러스에 외부 유전자를 삽입하게 되면 바이러스의 증식 자체에 영향을 줄 가능성이 있다. 본 연구에서 제작된 YYFF-HPV16-E7이 외부 유전자의 삽입에 의해 바이러스 자체의 특성에 변화가 생겼는지 확인하기 위해 one-step 성장곡선(growth curve)을 조사하였다. YYFF와 YYFF-HPV16-E7의 growth curve를 살펴보면 세포 내의 바이러스 양은 감염 후 1~6시간 동안은 YYFF-HPV-E7의 양이 적지만, 시간이 지남에 따라 YYFF와 비교해 보았을 때 비슷한 양이 발견되었다(Fig. 2A). 상층액에서는

감염 초기부터 YYFF와 YYFF-HPV-E7이 비슷한 성장 양상을 보였다(Fig. 2B). 이 결과로 미루어 보아 YYFF와 YYFF-HPV16-E7의 증식능력은 별 차이가 없는 것으로 판단된다.

YYFF-HPV16-E7에서 E7의 발현 확인

YYFF-HPV16-E7의 E7 단백질의 발현을 확인하기 위해 감염된 세포 내에서 E7의 mRNA와 단백질의 발현을 확인하였다. HeLa 세포에 두 바이러스를 각각 감염시킨 후 RNA를 추출하고 reverse transcription을 수행한 뒤 E7 primer를 사용하여 PCR을 실시하여 전기영동으로 확인한 결과 YYFF-HPV16-E7을 감염시킨 세포에서 E7의 mRNA가 형성이 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). YYFF-HPV16-E7에 감염된 세포의 lysate와 E7 특이적 항체를 이용하여 Western blot을 수행한 결과 E7 단백질 역시 발현이 되는 것을 확인하였다(Fig. 3B). 또한 면역형광항체법 실험 결과도 동일하게 YYFF-HPV16-E7에 감염된 세포에서 E7에 양성인 형광을 발견할 수 있었다(Fig. 3C). 위의 결과들을 통해 YYFF-HPV16-E7은 세포 내에서 정상적으로 E7을 발현하고 있음을 확인할 수 있었다.

TC-1 세포를 이식한 마우스에 대한 YYFF-HPV16-E7의 효과 확인

YYFF-HPV16-E7의 자궁경부암에 대한 치료용 백신으로서의 가능성을 알아보기 위해 E7을 지속적으로 발현하는 TC-1 세포를 C57/BL6 mouse의 옆구리 부분에 피하주사로 이식하였다. 10일 후에 종양이 생성된 것을 확인한 후 YYFF-HPV16-E7 바이러스를 감염시켜 종양의 크기

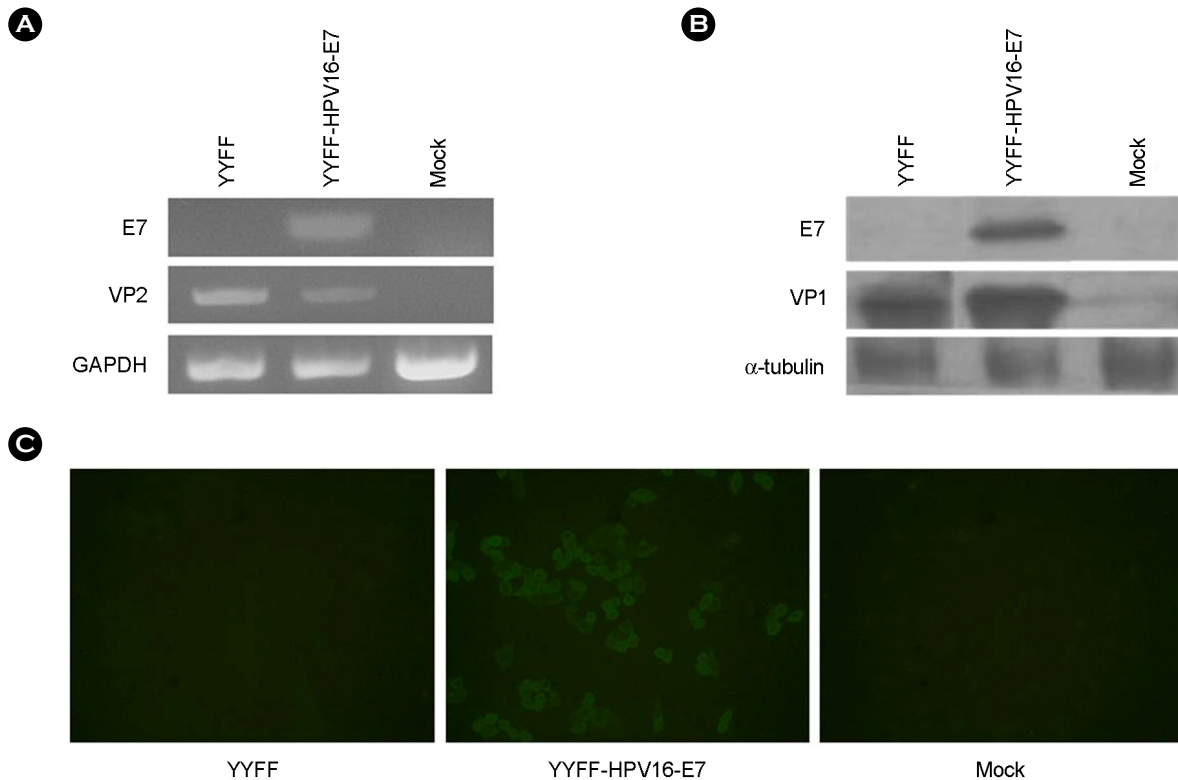


Figure 3. Expression of E7 and VP1 in HeLa cells infected with YYFF and YYFF-HPV16-E7. The HPV16 E7 mRNA was detected by RT-PCR using the specific primer set (A). The E7 protein was detected by Western blot analysis using anti-HPV E7 and anti-VP1 (B), and IFA using anti-HPV E7 (C). Mock indicates uninfected HeLa cells.

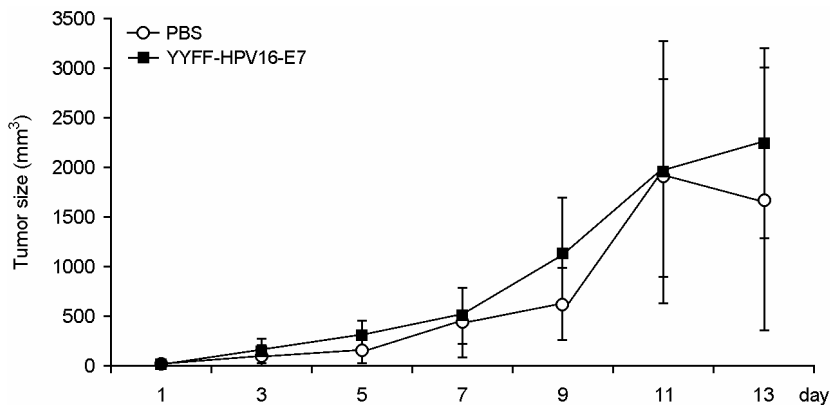


Figure 4. Antitumor therapeutic effects of YYFF-HPV16-E7 in C57/BL6. PBS (○) and YYFF-HPV16-E7 (■) were injected into C57/BL6 mice that carried TC-1 tumor cells. Each group contained three mice.

변화를 관찰하였다. 바이러스 접종 후 13일째에 바이러스가 감염된 일부 마우스의 종양 크기가 약간 줄어드는 것처럼 보이는 현상을 관찰하였으나 통계적으로 유의미하지는 않았다. 따라서 전반적으로는 뚜렷한 종양의 감소는 관찰되지 않았다(Fig. 4). 이의 원인을 확인하기 위해 C57/BL6 mouse에 CVB3를 감염시킨 결과 바이러스의 증식이 뚜렷하지 않음을 확인하였다(data not shown). 즉

바이러스가 C57/BL6 mouse에서는 활발히 증식되지 않아 면역 반응이 유도되지 않았고 따라서 기대했던 종양 감소 효과를 볼 수 없었다고 판단되었다.

이를 극복하기 위해 CVB3가 감염될 수 있는 BALB/c 유래 nude mouse에 TC-1 세포를 위와 동일한 방법으로 옆구리에 피하주사 하여 자궁경부암 모델을 만들었다. 동시에 YYFF-HPV16-E7 바이러스를 BALB/c mouse에 감

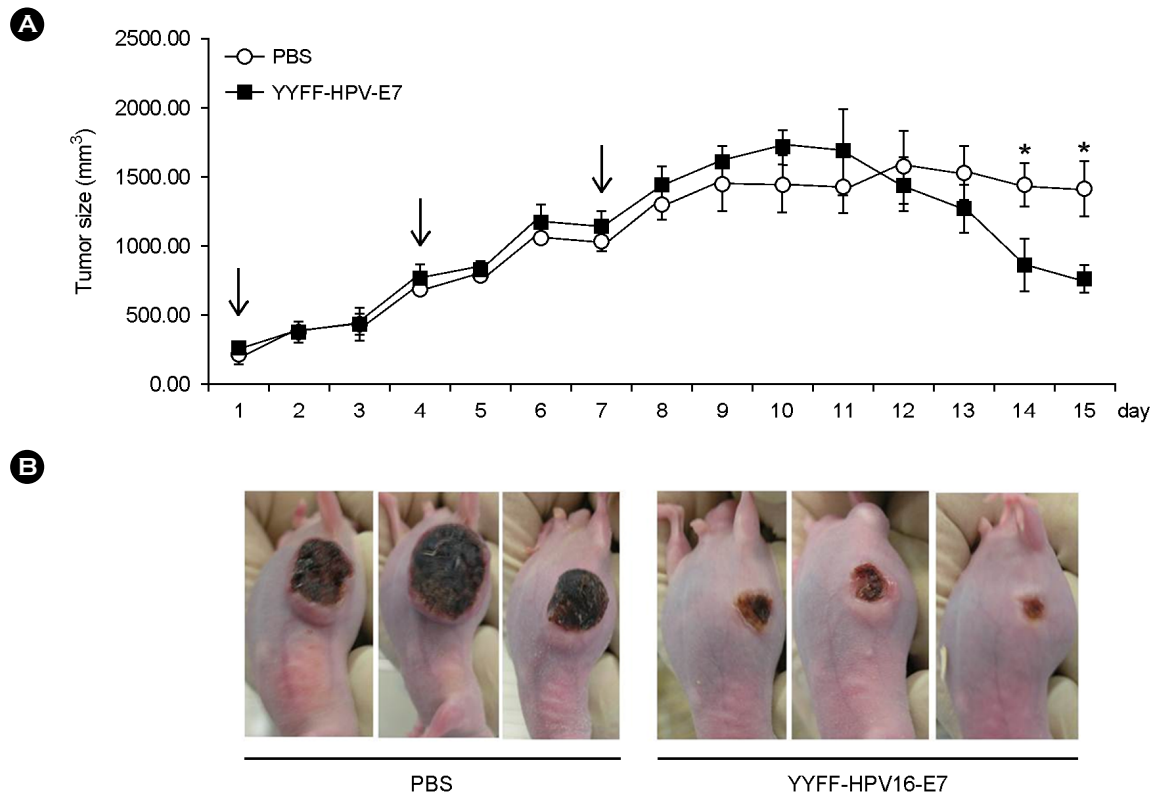


Figure 5. Antitumor therapeutic effects of PBS (○) and YYFF-HPV16-E7 (■) in BALB/c nude mice. Passive immunization (↓) was conducted three times, with a three day interval. * $P < 0.05$, compared to control. (A) Tumor size. (B) Tumor morphology 15 days after passive immunization.

염시킨 뒤 mouse 혈청 및 면역 세포를 nude mouse에 정맥투여로 3일 간격으로 3회 주입하여 passive immune response를 유도하였다. 실험 결과 종양 형성 후 11일까지는 큰 차이를 보이지 않다가 12일부터 PBS를 주입한 mouse에서 유래한 혈청 및 면역 세포를 넣어준 mouse 보다 YYFF-HPV-E7을 감염시킨 mouse의 혈청 및 면역 세포를 넣어 준 mouse의 TC-1 유래 종양의 크기가 급격히 줄어 들기 시작하였다(Fig. 5).

고 찰

본 연구진은 이미 선행 연구를 통해 YYFF를 이용하여 다양한 외부 유전자를 발현할 수 있음을 보여주었다 (8~10). 예를 들면 HCV E2 유전자를 발현시켜 이에 대한 항체 생성이 mouse에서 가능함을 보여주었으며 (9), 혈관 신생 인자인 human fibroblast growth factor (hFGF)를 발현하는 재조합 바이러스를 제작하였고 발현된 hFGF가 혈관 신생을 촉진하고 있음을 확인하였다(submitted for

publication). 또한 다른 연구자들 역시 coxsackievirus 벡터 시스템을 활용하여 외부 유전자를 발현할 수 있고 발현된 외부 유전자에 대해 항체가 생성될 수 있음을 증명하였다 (7, 13~15). 예를 들면 adenovirus의 캡시드 단백질인 1D와 viral protease 2A를 CVB3에 삽입한 결과 안정적으로 단백질이 형성이 되고 이것이 항원으로 작용하여 면역 반응을 일으켰다는 연구 보고가 있으며 (10), 또 CVB3에 murine IL-4 및 interferon γ 를 삽입한 결과 발현된 외부 유전자들이 생물학적인 활성을 보인다는 연구 역시 발표되었다 (8).

이러한 선행 연구 결과들을 토대로 본 연구에서는 이미 개발된 attenuated coxsackievirus B3 (YYFF) 시스템이 유전자 치료용 바이러스 벡터 시스템으로 활용 가능한지를 확인하고자 하였다. 이를 위해 본 연구진은 자궁경부암 모델을 이용하였다. 이 모델은 이미 많은 선행 연구에 의해 HPV16 바이러스에 의해 자궁경부암이 발생하는 기전 및 동물 모델로 확립되어 있으며 (16), 또한 암 모델을 만들기 위한 TC-1 세포주가 E7을 발현하고 있다고

알려져 있다 (17). 따라서 본 연구에서 개발된 YYFF-HPV16-E7의 면역력을 통해 유도된 면역 반응을 통해 암 세포주인 TC-1 세포주를 제거할 수 있을 것으로 기대하였다.

본 연구에서 개발된 YYFF-HPV16-E7 바이러스는 HeLa 세포에서 parent 바이러스인 YYFF와 유사하게 성장하고 있으며 E7을 *in vitro*에서 정상적으로 발현하고 있음을 확인하였다(Figs. 2 and 3). 그러나 일반적으로 자궁경부암 동물 모델로 사용되는 TC-1 세포주가 이식된 C57/BL6 mouse에 YYFF-HPV16-E7을 접종한 결과 종양 세포 감소를 보여주지 못했다(Fig. 4). 그 이유는 사용한 C57/BL6 mouse에 coxsackievirus가 원활하게 증식하지 못했기 때문으로 판단되었다(data not shown). 이러한 실험상의 문제점을 극복하기 위해 TC-1 세포주를 BALB/c 유래의 nude mouse에 이식하여 종양 동물 모델을 만든 후 coxsackievirus가 감염될 수 있는 BALB/c에 YYFF-HPV-E7을 접종하여 면역 반응을 유도한 다음 mouse 혈청 및 면역 세포를 TC-1 세포주가 종양을 일으킨 nude mouse에 넣어 주었다. 이런 passive immunization을 시도한 이유는 TC-1 세포주가 종양을 형성한 mouse는 nude mouse이기 때문에 흉선이 없고 따라서 Th 세포를 포함한 T 세포가 생성되지 못해 관련 면역 반응이 일어나지 않기 때문이다 (18). 실험 결과 YYFF-HPV16-E7에 의해 유도된 passive immunization이 종양의 크기를 줄여 줄을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이러한 암세포 파괴 면역 반응이 passive immunization에 사용한 혈청 안의 E7에 특이적인 면역 세포들로 인한 반응인지 혹은 E7에 특이적인 항체에 의한 antibody dependent cell cytotoxicity (ADCC) 반응인지는 아직 확실하지 않다. 이에 대한 향후 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

이러한 결과들을 토대로 본 연구진은 사전에 개발한 YYFF system이 다양한 외부 유전자를 *in vitro* 및 *in vivo*에서 발현할 수 있으며 이러한 능력을 활용하여 다양한 암 및 바이러스 질환에 대한 유전자 치료 시스템 구축에 활용될 가능성이 충분함을 보여주었다.

참 고 문 헌

- 1) Polo JM, Dubensky TW Jr. Virus-based vectors for human vaccine applications. *Drug Discov Today* 2002;7:719-27.
- 2) Jiang H, Pierce GF, Ozelo NC, de Paula EV, Vargas JA, Smith P, *et al.* Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol Ther* 2006;14:452-5.
- 3) Lyon AR, Sato M, Hajjar RJ, Samulski RJ, Harding SE. Gene therapy: targeting the myocardium. *Heart* 2008;94:89-99.
- 4) Ziello JE, Huang Y, Jovin IS. Cellular endocytosis and gene delivery. *Mol Med* 2010;16:222-9.
- 5) Waehler R, Russell SJ, Curiel DT. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2007;8:573-87.
- 6) Bouard D, Alazard-Dany D, Cosset FL. Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br J Pharmacol* 2009;157:153-65.
- 7) Henke A, Jarasch N, Wutzler P. Coxsackievirus B3 vaccines: use as an expression vector for prevention of myocarditis. *Expert Rev Vaccines* 2008;7:1557-67.
- 8) Kim DS, Nam JH. Characterization of attenuated coxsackievirus B3 strains and prospects of their application as live-attenuated vaccines. *Expert Opin Biol Ther* 2010;10:179-90.
- 9) Kim YJ, Yun SH, Lim BK, Park KB, Na HN, Jeong SY, *et al.* Systemic analysis of a novel coxsackievirus gene delivery system in a mouse model. *J Microbiol Biotechnol* 2009;19:307-13.
- 10) Kim DS, Cho YJ, Kim BG, Lee SH, Nam JH. Systematic analysis of attenuated Coxsackievirus expressing a foreign gene as a viral vaccine vector. *Vaccine* 2010;28:1234-40.
- 11) McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 2009;384:335-44.
- 12) Chu NR, Wu HB, Wu T, Boux LJ, Siegel MI, Mizzen LA. Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. *Clin Exp Immunol* 2000;121:216-25.
- 13) Miller JP, Geng Y, Ng HL, Yang OO, Krogstad P. Packaging limits and stability of HIV-1 sequences in a coxsackievirus B vector. *Vaccine* 2009;27:3992-4000.
- 14) Lim BK, Shin JO, Lee SC, Kim DK, Choi DJ, Choe SC, *et al.* Long-term cardiac gene expression using a coxsackieviral vector. *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:745-51.
- 15) Henke A, Jarasch N, Wutzler P. Coxsackievirus B3 vaccines: use as an expression vector for prevention of myocarditis. *Expert Rev Vaccines* 2008;7:1557-67.
- 16) He Z, Wlazlo AP, Kowalczyk DW, Cheng J, Xiang ZQ, Giles-Davis W, *et al.* Viral recombinant vaccines to the E6 and E7

- antigens of HPV-16. *Virology* 2000;270:146-61.
- 17) Fazeli M, Soleimanzahi H, Ghaemi A, Farzanepour M, Amanzadeh A, Hashemi SR. Efficacy of HPV-16 E7 based vaccine in a TC-1 tumoric animal model of cervical cancer. *Cell Journal* 2011;12:483-8.
- 18) Stephenson RA, Dinney CP, Gohji K, Ordoñez NG, Killion JJ, Fidler JJ. Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:951-7.
-