

AUS DER FRAUENKLINIK DER
HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF
DIREKTOR: UNIV.-PROF. DR. H.G. BENDER

Experimentelle Untersuchungen
adenoviral-onkolytischer Gentherapie-
Ansätze für gynäkologische
Malignomerkrankungen

HABILITATIONSSCHRIFT
ZUR ERLANGUNG DER VENIA LEGENDI FÜR DAS FACH
FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE

VORGELEGT DER
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER
HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT
DÜSSELDORF

VON
GERD JOHANNES BAUERSCHMITZ
2007

Tue, was in Deiner Macht steht,
akzeptiere, was nicht in Deiner Macht steht,
und lerne den Unterschied zwischen beiden zu erkennen.

Marc Aurel

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	6
Stand der Forschung	8
Material und Methoden	13
1. Zelllinien und primäre Zellkultur (I-IV)	13
2. Adenovirale Vektoren und Replikationskompetente Adenovirussen (I-IV)	14
2.1 Konstruktion der cox-2 CRAbs (IV)	17
2.2 Amplifizierung der Viren (I-IV)	18
3. In vitro Experimente (I-IV)	18
3.1 Luciferase Assay (I)	18
3.2 LacZ-Färbung (I)	18
3.3 RT-PCR (I)	19
3.4 Kristallviolett Assay (II)	19
3.5 Protein basierter Oncolyse Assay (II, III, IV)	20
3.6 Quantitative PCR (II, III, IV)	20
3.7 Oncolyse Assay für mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) (III)	21
3.8 Nachweis viraler Replikation in PBMC (III)	22
3.9 Aufnahme von Tritium-markierten Thymidin in PBMC (III)	22
3.10 Bestimmung der viralen Replikation mittels TCID50 (IV)	22
4. Präklinische, in vivo Evaluation der Viren	23
4.1 Therapeutisches Ovarialkarzinom-Modell (II)	23
4.2 Zervixkarzinom Tiermodell (III)	23
4.3 Biodistribution for Ad5- Δ 24RGD (III)	23
4.4 In vivo Imaging und Überleben der dreifach modifizierten CRAbs (IV)	24
5. Statistik (II, III, IV)	25

Ergebnisse	26
1. Transkriptionales Targeting von Teratokarzinomzellen mit Hilfe des flt-1 Promotors (I)	26
2. Infektiosität von Ovarialkarzinomzellen mit dem konditional replikativen Adenovirus Ad5- Δ 24RGD (II)	27
3. Therapeutischer Effekt des konditional replizierenden Adenovirus Ad5- Δ 24RGD in einem orthotopen Ovarialkarzinom-Mausmodell (II)	28
4. Infektiosität von Zervixkarzinomzellen mit dem konditional replikativen Adenovirus Ad5- Δ 24RGD (III)	30
5. Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC) können von Ad5- Δ 24RGD infiziert, aber nicht lysiert werden (III)	30
6. Biodistribution und Virusreplikation in vivo des konditional replikativen Adenovirus Ad5- Δ 24RGD (III)	32
7. Therapeutische Effektivität des konditional replikativen Adenovirus Ad5- Δ 24RGD in einem Zervixkarzinom-Mausmodell (III)	33
8. Effekt der Kombination von Promotor und Deletion auf die Selektivität und Effektivität von konditional replikativen Adenoviren (IV)	34
9. Therapeutische Effektivität ausgewählter dreifach-modifizierter selektiv onkolytischer Adenoviren in vivo (IV)	39
Diskussion	40
1. Methoden der Karzinomgentherapie	41
2. Gentransfermethoden	44
3.1 Adenoviren in der Gentherapie	45
3.2 Klinische Studien mit adenoviralen Vektoren	47
4.1 Transkriptionales Targeting	48
4.1.1 Tumor-spezifische Promotoren	48
4.1.2 Tumorgefäß-spezifische Promotoren	50
4.1.3 Therapie-induzierte Promotoren	51
4.2 Transduktionales Targeting	51
4.2.1 Genetisches transduktionales Targeting	51

4.2.2 <i>Fiber-Chimären</i>	52
4.2.3 <i>Physikalisches transduktionales Targeting</i>	53
5.1 Konditional replizierende Adenoviren (CRAds) als onkolytische Agenzien	55
5.2 Gerichtete konditional replizierende Adenoviren	58
5.3 Klinische Studien mit CRAds	60
6. Modellsysteme – primäre Tumorzellen und Spheroide	61
7. Zukunftsperspektiven	62
8. Schlußfolgerungen	63
Zusammenfassung	66
Danksagung	68
Literatur	70

Einleitung

Gentherapie ist vom Grundkonzept her ein vielversprechender neuer Ansatz für gegen derzeit angewandte Therapiemodalitäten resistente Karzinome. Sie basiert auf den molekularen Unterschieden zwischen normalen und Tumorzellen, welche für diese gezielte Therapieoption genutzt werden. Verschiedene Strategien befinden sich aktuell in klinischer Erprobung, von denen einige ermutigende erste Ergebnisse zeigten, insbesondere für Ansätze zur Kompensation von Mutationen, mit molekularer Chemotherapie oder mit replikationskompetenten Viren. Adenoviren sind die derzeit populärsten Vektoren, und die zunehmende Menge klinischer Daten läßt eine exzellente Therapiesicherheit für Karzinompatienten vermuten. Untersucht werden Ansätze, um eine gezielte Steuerung der Genexpression in Tumorzellen mittels tumorspezifischer Promotoren zu erreichen. Ein sich ebenfalls rasant entwickelndes Feld ist das der replikationskompetenten Vektoren, die eine verbesserte Tumorpenetration und lokale Amplifizierung des anti-Tumor Effektes ermöglichen. Des weiteren können Strategien zur Infektiositätssteigerung die unterschiedliche und oft geringe Expression des primären adenoviralen Rezeptors auf Tumorzellen überwinden, welche ursächlich für die geringe klinische Effektivität früherer Ansätze sein könnte. Adenovirale Gentherapie für Karzinome weist keine Kreuzresistenz mit anderen Therapieoptionen auf. Daher sind synergistische Effekte möglich und für die Kombination mit Chemotherapie beschrieben (1).

Transkriptionelles Targeting gynäkologischer Karzinomzellen mit Hilfe des Promotors für den vascular endothelial growth factor Rezeptortyp I (flt-1) wurde untersucht. Flt-1 wird nicht in der Leber exprimiert und ist daher ein idealer Promotor zum transkriptionalen Targeting von Adenoviren. Unsere Untersuchungen zeigten, daß der flt-1 Promotor in Teratokarzinomen aktiv und damit ein möglicher Kandidat zur Entwicklung onkolytischer Adenoviren zur Behandlung dieser oft problematischen Erkrankung ist.

Ein Tropismus-modifiziertes konditional replikatives Adenovirus (CRAd), Ad5- Δ 24RGD, wurde untersucht an gynäkologischen Karzinomen. Ad5- Δ 24RGD ist ein Adenovirus, welches selektiv in Zellen repliziert, die einen defekten p16/Rb Pathway aufweisen. Dieser Pathway ist defekt in nahezu allen Tumorzellarten. Der Fiber von

Ad5- Δ 24RGD beinhaltet ein integrinbindendes Arginin-Glyzin-Aspartam Element (RGD-4C), welches eine Infektion der Tumorzellen unabhängig vom Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) erlaubt. Dies ist ein sehr attraktiver Ansatz zur Behandlung gynäkologischer Karzinomzellen, da deren Expression von CAR hochvariabel und meist sehr gering ist. Wir konnten Onkolyse für ein weites Spektrum von Ovarial- und Zervixkarzinomzellen zeigen, ebenso wie von Sphäroiden primärer Ovarialkarzinomzellen. Dies ist ein neues System zur Untersuchung primärer Tumorsubstrate in vitro, insbesondere für die experimentelle Erprobung von onkolytischen bzw. konditional replizierenden Adenoviren (CRAds). Die Biodistribution von Ad5- Δ 24RGD wurde untersucht und präklinische Daten zur Therapiesicherheit konnten gewonnen werden mit dem Nachweis fehlender Replikation in humanen mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC). Mit verschiedenen orthotopen Mausmodellen konnte die hohe Effektivität von Ad5- Δ 24RGD auch in vivo nachgewiesen werden. In einem hochaggressiven intraperitonealen Modell disseminierter Ovarialkarzinomzellen führte die Therapie mit Ad5- Δ 24RGD zu einer kompletten Tumoreradikation bei 50% der Mäuse.

Um die Selektivität und Spezifität von CRAds weiter zu verbessern, wurden dreifach modifizierte onkolytische Adenoviren geklont. Sie beinhalten den cyclo-oxygenase-2 (cox2) Promotor, E1A Transkomplementation und sind Serotypchimären. Wir untersuchten Spezifität und onkolytische Potenz dieser CRAds an Ovarialkarzinomzellen anhand zwei verschiedener Versionen des cox2 Promotors in Kombination mit drei verschiedenen Varianten von E1A (Wildtyp, delta24 und delta2delta24). Ad5/3cox2Ld24 erwies sich als Virus mit der besten Kombination, da es erhöhte Selektivität ohne Verlust an Effektivität sowohl in vitro als auch in aggressiven intraperitonealen Ovarialtumormodellen zeigte.

Zusammenfassend ergeben die therapeutische Effektivität der in dieser Studie getesteten CRAds zusammen mit den positiven Biodistributions- und Sicherheitsdaten eine Grundlage, diese für translationale Forschungsansätze mit klinischen Studien für gynäkologische Karzinome einzusetzen.

Stand der Forschung

Das zunehmende Verständnis von molekularen Grundlagen und genetischen Variationen von Krebserkrankungen erlaubt die Entwicklung neuer, zielgesteuerter Therapieansätze. Die somatische Gentherapie bietet besondere Voraussetzungen zum Erreichen dieses Zieles (2).

Ein zentrales Prinzip der Gentherapie ist der erfolgreiche Transfer von genetischer Information mit dem Ziel eines spezifischen therapeutischen Effektes. Zwei Probleme müssen zu diesem Zweck erfolgreich gelöst werden. Zum einen ist es notwendig, für einen ausreichenden Gentransfer in das Zielgewebe zu sorgen. Zum anderen ist eine zellspezifische Aktivierung des übertragenen therapeutischen Genmaterials wünschenswert, um gesundes Gewebe zu schonen. Ein aussichtsreicher Kandidat zur Entwicklung eines entsprechenden Gentransfersystems („Vektor“) ist das humane Adenovirus Serotyp 5. Es lässt sich vielfältig genetisch modifizieren, ist auch modifiziert *in vitro* und *in vivo* stabil; es infiziert effektiv sowohl teilende als auch ruhende Zellen und ist nicht Auslöser einer potentiell gefährlichen Erkrankung des Menschen. Zusätzlich ist die Produktion von ausreichenden Dosen in therapeutisch einsetzbarer Qualität („good manufacturing practice quality“ ,GMP) etabliert (2).

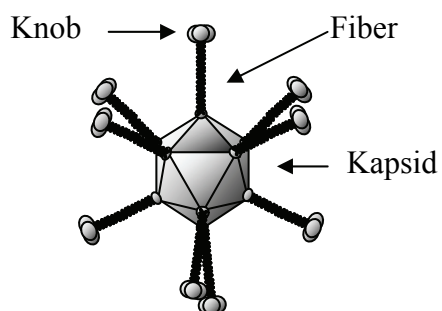


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Adenovirus Typ 5

Trotz dieser theoretischen Vorteile zeigten erste klinische Erfahrungen mit den *in vitro* sehr erfolgreichen replikationsdefizienten Adenoviren der sogenannten ersten Generation nur geringen bis keinen Erfolg. Ursächlich hierfür war, dass beide der

oben genannten Voraussetzungen zur erfolgreichen Gentherapie in vivo nicht erfüllt worden waren (2).

Es zeigte sich, dass das natürliche Vorkommen und Verteilungsmuster des primären Rezeptors von Adenovirus Typ 5, des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor „CAR“, höchst ungleichmäßig ist. Dieser Rezeptor ist fast ausschließlich bei epithelialen Gewebetypen zu finden und die Rezeptordichte kann im Rahmen der malignen Transformation von epithelialeem Gewebe bis hin zur völligen Abwesenheit des Rezeptors reduziert werden (3-14). Daher ist insbesondere in der onkologischen Gentherapie in vivo ein ausreichender Gentransfer mit unmodifizierten Adenoviren nur schwer möglich. Verschiedene Ansätze sollen dieses Problem lösen. Der Ansatz des sogenannten „infectivity enhancements“, also der gesteigerten Infektiosität für das Zielgewebe unter Beibehaltung von CAR als Zielrezeptor, erlaubte erstmals erfolgreiche Transferquoten und damit eine suffiziente Gentherapie auch in vivo. Der bekannteste Ansatz ist die RGD-4C-Modifizierung des Virus (11, 15, 16). Die RGD-4C-Domäne ist Bestandteil der viralen Hülle und als solcher mitverantwortlich zur erfolgreichen Infektion. Nach Andocken des Virus mit seinem sogenannten Fiber an CAR, erfolgt die Integration des Virus in die Zelle mittels dieses RGD-Motivs des Virus und der durch die Zelle exprimierten Integrine. Das Einklonieren der RGD-4C Domäne nahe der Andockstelle des Virus im Fiber erlaubt eine direkte Anknüpfung des Virus an die Integrine unter Umgehung des CAR (11, 15). Integrine werden im Rahmen der malignen Transformation nicht niedriger exprimiert, sondern nehmen auf der Tumorzelloberfläche eher noch zu (11, 15). Mit dieser Virusmodifikation wird eine um 2-3 Zehnerpotenzen höhere Transduktion von malignen Zellen im Vergleich zu unmodifizierten Adenoviren erreicht. Bei benignen Zellen dagegen bleibt die Transduktionsrate nahezu konstant (11, 15). Diese Virusmodifikation führte zu einer gewissen „Tumorspezifität“ des Virus und damit zu ersten erfolgreichen Ansätzen, welche tierexperimentiell auch in vivo überzeugen konnten.

Zusätzlich wurde an weiteren Veränderungen der Virushülle gearbeitet mit dem Ziel das CAR-abhängige natürliche „Targeting“ des Virus durch alternative tumorzellspezifisches Targeting zu ersetzen. Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Ansätze der Virusmodifikation, welche entweder die eigentliche Zellinfektion (transduktionales Targeting) oder die spätere Genexpression (transkriptionales Targeting) betreffen.

Transduktionales Targeting hat eine zielzell-spezifische Veränderung des viralen Bindungsmechanismus an die Zelle zum Ziel. Dies kann durch zwischengeschaltete Linkerelemente oder durch direkte Veränderungen an der Virushülle geschehen. Linker sind z.B. bispezifische Antikörper mit CAR auf Seiten des Virus und gegen einen spezifischen Rezeptor an der Zielzelle. In mehreren Ansätzen wurde dies erfolgreich erprobt. In vivo Experimente zeigten eine ausreichende Stabilität dieser Komplexe aus Virus und Linkerelement auf. Bispezifische Adaptermoleküle beinhalten u.a. bispezifische Antikörper, chemische Konjugate von Antikörper-Fragmenten (z.B. Fab) (4, 17-22) und zielselektiven Liganden (z.B. Folat) oder zellspezifischen Rezeptoren (z.B. EGFR) und rekombinante Fusionsproteine (23, 24). Drei verschiedene genetische Veränderungen an der Virushülle sind derzeit in Erprobung: 1. Fiber-pseudotypisierung, 2. die Inkorporierung neuer Liganden in den Fiber und 3. die Entfernung des „Fiberknobs“. Die Pseudotypisierung besteht aus einer Kombination verschiedener Typen von „Fiber“-Proteinen (entsprechen einem „Abstandselement“ zwischen Virushülle und Bindungselement) und „Knob“-Proteinen (eigentliches Bindungselement) in einem Virus. Die Kombination von Ad5-Fiber und Ad3-Knob hat sich als besonders selektive Chimäre für die Transduktion von Ovarialkarzinomzellen gezeigt (25, 26). Die Inkorporation neuer Liganden in den Fiber mit gleichzeitiger Ablation des natürlichen Tropismus (komplette Ausschaltung der Bindung des Adenovirus an den CAR-Rezeptor durch Entfernen des originären Knob) konnte durch ein synthetisches Fibertrimerisat mit angeknüpfter neuer Bindungsstelle erreicht werden.

Transkriptionales Targeting erfolgt mittels eines dem viralen Genom vorgeschalteten Steuerelements. Dieses zielzellspezifische Steuerelement (Promotor) kontrolliert entweder das übertragene Gen oder im Falle von replizierenden Viren deren Replikation selbst. Ein idealer Tumor-spezifischer-Promotor (TSP) ist nur in den Tumorzellen aktiv, und sollte insbesondere in der Leber als Hauptabbauort für Adenoviren nicht aktiv sein. Als einer der ersten tumorspezifischen Promotoren wurde der Promotor des „Carcino-embryogenen Antigen“ (CEA) (27) erfolgreich getestet, welches in zahlreichen gastrointestinalen, pankreatischen und Lungenkarzinomvarianten exprimiert wird (27). Für das Ovarialkarzinom ist der cox-2 Promotor von besonderem Interesse (28). Er ist nachgewiesenermaßen hochaktiv in diesen Tumorzellen und nicht aktiv in der Leber. Dies macht ihn zu einem idealen TSP für gynäkologische Tumoren (29).

Die Tumorzellresistenz gegenüber zytotoxischen Agenzien zählt zu den wichtigsten limitierenden Faktoren einer erfolgreichen Chemotherapie. Die Multidrugresistenz (mdr1) ist ein relevanter Resistenzmechanismus von Primärtumoren und resistenten Rezidiven bei humanen Leukämien und soliden Tumoren (30, 31). Gerade Ovariakarzinome entwickeln häufig im fortgeschrittenen Stadium multiple Resistenzen gegenüber Zytostatika (32).

In gentherapeutischen Ansätzen besteht die Option, unter Verwendung des mdr-Promotors maligne chemoresistente Tumorzellen abzutöten, die mit konventionellen Therapieverfahren nicht erreicht werden. Bei der mdr-Promotor gesteuerten Suizidgenexpression konnte bereits im Tierversuch eine effiziente Tumorregression sowie gute Virustoleranz nachgewiesen werden (33).

Frühe Strategien nutzten eine als Suizidgentherapie bezeichnete Variante der Gentherapie und erbrachte erste, insbesondere vorklinische Erfolge, die sich leider in klinischen Tests oft nicht wiederholen ließen (2).

Die für eine erfolgreiche Tumorthherapie notwendige Transduktionsrate konnte insbesondere bei größeren Tumoren bislang nicht erreicht werden. In Abhängigkeit von der Applikationsart wurden nur wenige Millimeter Tumorgewebe infiltriert und abgetötet (2). In der Folgezeit wurde eine zielgerichtete und kontrollierte Replikation von Viren in Zielzellen mit nachfolgender Infizierung und Abtötung weiterer benachbarter Zielzellen als effizienzsteigerndes Prinzip diskutiert. Konditional replizierende Adenoviren (CRAds = conditionally replicative adenovirus) erfüllen diesen Anspruch. Durch zielzellspezifische Steuerung der viralen Replikation wird diese auf Tumorzellen beschränkt und ist in normalem Gewebe nahezu unmöglich (2). Gesteuert werden kann die Replikation der CRAds auf zwei verschiedene Arten: 1. durch Vorschaltung eines TSP vor ein essentielles Gen der viralen Replikation (z.B. das E1 Gen = „early replication gene 1“) oder 2. durch genetische Veränderungen in den Replikationsgenen selbst, die ihre Funktion auf bestimmte Zellen limitieren.

Als erstes CRAd wurden Daten mit dem ONYX-015 Virus publiziert (34-37). In diesem CRAd-System sind zwei Mutationen im E1B 55-kd Protein dafür verantwortlich, dass dieses Virus sich nur in Zellen mit mutiertem p53 erfolgreich replizieren kann, in normalem Gewebe ist die Replikation drastisch erschwert. Dieses CRAd wird bereits in Phase-III Studien getestet und zeigt insbesondere in Kombination mit Chemotherapeutika Erfolge in der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren (38, 39). Die

zweite Gruppe weist eine 24-Basenpaar-Mutation ($\Delta 24$) in E1A auf. E1A ist der erste Abschnitt des E1-Gens, welches als frühes Replikationsgen essentiell für die Virusreplikation ist. Folge ist eine Abhängigkeit der viralen Replikation von einem mutierten Rb-p16 (40, 41). Dies zeigte sich bisher als spezifisch für Tumorzellen und nicht nachweisbar in Normalgewebe. Interessanterweise wird die Virusreplikation auch behindert, wenn in eine Zelle nachträglich ein intaktes Rb-p16 eingefügt wird (40). Als weitere Delta-Modifikation wurde $\Delta 2$ entdeckt, welches an ein mutiertes p300-Protein gebunden ist, eine weitere typische Mutation vieler menschlicher Tumorzellen (42). Wichtig ist anzumerken, dass alle im Vorfeld beschriebenen Modifikationen auch an CRAds möglich sind, diese also mehrfach modifiziert werden können.

Material und Methoden

Eine detaillierte Beschreibung der Methoden befindet sich in den Originalpublikationen.

1. Zelllinien und primäre Zellkultur

Tabelle 1. Liste der humanen Zelllinien dieser Arbeit

Zelllinie	Beschreibung	Publikation
293	Transformierte embryonale Nierenzellen	I, II, III, IV
911	Transformierte embryonale Retinoblasten	IV
A549	Adenokarzinom der Lunge	II, III, IV
ES-2	Ovarialadenokarzinom	IV
Hey	Ovarialadenokarzinom	IV
OV-4	Ovarialadenokarzinom	IV
SKOV-3.ip1	Ovarialadenokarzinom	IV
NCCIT	Testiculäres Teratokarzinom	I
NTERA-2	Testiculäres Teratokarzinom	I
PA-1	Teratokarzinom des Ovars	I
F9	Teratokarzinom des Ovars (murin)	I
AU565	Mammakarzinom	I
GI-101A	Mammakarzinom	I
ZR-75-1	Mammakarzinom	I
C33A	Zervixkarzinom	III
Caski	Zervixkarzinom	III
Hela	Zervixkarzinom	III
SiHa	Zervixkarzinom	III
BEAS-2B	Lungenepithelzellen	I
BT474	Adenokarzinom der Mamma	IV
FHS173WE	Fibroblasten	IV
HMEC	Brustendothelzellen	IV
HUVEC	Venöse endotheliale Zellen	III
nHEPs	Hepatozyten	IV

Primäre Adenokarzinomzellen des Ovars wurden immunomagnetisch von malignem Aszites gewonnen, welcher von Patientinnen, die sich einer Punktion in der Frauenklinik der Universität von Alabama in Birmingham unterzogen, zu Forschungszwecken bereitgestellt wurde (43). Ovarialkarzinomzellen wurden an einen anti-TAG-72-Mausantikörper gebunden (CC-49, großzügig bereitgestellt von Dr. J. Schlom, National Institute of Health, Bethesda, MD) und nachfolgend mittels metallisierter anti-Maus-IgG (Pan Mouse IgG Dynabead, Dynal AS, Oslo, Norwegen) magnetisch separiert (II).

Gewinnung und Analyse der primären Ovarialkarzinom-Sphäroide (II) wurde bereits ausführlich beschrieben (44). Aufbereitete, unpassagierte Zellen wurden über Nacht in mit 3% Agar beschichteten Zellkulturflaschen auf einem Rüttler inkubiert. Die so erzeugten Spheroide, i.e. dreidimensionale Zellstrukturen, wurden resuspendiert und direkt nachfolgend infiziert.

Mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells - PBMC) wurden aus frischem Zitratblut von gesunden Spendern separiert. Hierzu wurde das Blut mit PBS (Mediatech, Herndon, VA) gemischt, vorsichtig mit Histopaque®-1077 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO) unterlegt und schließlich 20 Minuten zentrifugiert zur Gradientenbildung. Nach zwei Waschgängen in PBS wurden die Zellen zur Vitalitätsprüfung mit Trypan Blau (Mediatech) gefärbt und gezählt. Die weitere Inkubation erfolgte in Rundboden-96-Kammerplatten in RPMI 1640 Medium mit 2 mM L-Glutamin (Mediatech) und 10% FBS (HyClone).

2. Adenovirale Vektoren und Replikationskompetente Adenoviren (I-IV)

Tabelle 2. Liste der adenoviralen Vektoren dieser Arbeit

Virus	Beschreibung	Publikation
Ad5flt-1luc	E1-deletiert, Luciferasegen unter flt-1 Promotorkontrolle an Stelle von E1	I
AdCMVluc1	E1-deletiert, Luciferasegen unter CMV Promotorkontrolle an Stelle von E1	I

Ad5flt-1LacZ	E1-deletetiert, LacZ-Gen unter flt-1 Promotorkontrolle an Stelle von E1	I
Ad5CMVLacZ	E1-deletetiert, LacZ-Gen unter CMV Promotorkontrolle an Stelle von E1	I
Ad5lucRGD	E1-deletetiert, Luciferasegen unter CMV Promotorkontrolle an Stelle von E1, RGD-4C Modifikation im HI-loop der Knobdomäne	II, III
Ad5/3luc1	E1-deletetiert, Luciferasegen unter CMV Promotorkontrolle an Stelle von E1, Fiberchimäre aus tail und shaft von Ad5 mit der Knobdomäne von Ad3	IV

Tabelle 3. Liste der CRAAds dieser Arbeit

Virus	Beschreibung	Publikation
Adwt300	Adenovirus Wildtyp	III, IV
Ad5RGD	RGD-4C Modifikation im HI-loop der Knobdomäne	II
Ad5- Δ 24RGD	24-bp Deletion in CR2 von E1A, RGD-4C Modifikation im HI-loop der Knobdomäne	II, III
Ad5/3- Δ 24	24-bp Deletion in CR2 von E1A, Fiberchimäre aus tail und shaft von Ad5 mit der Knobdomäne von Ad3	IV
Ad5/3cox2LE1	E1A mit cox2L Promotor, Fiberchimäre aus tail und shaft von Ad5 mit der Knobdomäne von Ad3	IV
Ad5/3cox2Ld24	24-bp Deletion in CR2 von E1A mit cox2L Promotor, Fiberchimäre aus tail und shaft von Ad5 mit der Knobdomäne von Ad3	IV
Ad5/3cox2Ld2d24	24-bp Deletion in CR2 sowie zusätzliche 6-bp deletion in E1A mit cox2L Promotor, Fiberchimäre aus tail und shaft von Ad5 mit der Knobdomäne von Ad3	IV
Ad5/3cox2ME1	E1A mit cox2M Promotor, Fiberchimäre aus tail und shaft von Ad5 mit der Knobdomäne von Ad3	IV

Ad5/3cox2Md24	24-bp Deletion in CR2 von E1A mit cox2M Promotor, Fiberchimäre aus tail und shaft von Ad5 mit der Knobdomäne von Ad3	IV
Ad5/3cox2Md2d24	24-bp Deletion in CR2 sowie zusätzliche 6-bp deletion in E1A mit cox2M Promotor, Fiberchimäre aus tail und shaft von Ad5 mit der Knobdomäne von Ad3	IV

Tabelle 4. Plasmide zur Virusklonierung

Plasmid	Beschreibung	Publikation
pShuttle GL3Bcox-2pL	Shuttle plasmid mit GL3B unter cox2L Promotorkontrolle	IV
pShuttle GL3Bcox-2M	Shuttle plasmid mit GL3B unter cox2M Promotorkontrolle	IV
pSE1	Shuttle plasmid mit Wildtyp E1A	IV
pSE1d24	Shuttle plasmid mit 24-bp Deletion in CR2 von E1A	IV
pSE1d2d24	Shuttle plasmid mit 24-bp Deletion in CR2 sowie zusätzlicher 6-bp deletion in E1A	IV
pTU5/3	E1-deletiertes Ad5-Genom mit Fiberchimäre aus tail und shaft von Ad5 und der Knobdomäne von Ad3	IV

2.1 Konstruktion der cox-2 CRAds (IV)

Die sechs cox2-CRAds wurden folgendermaßen kloniert: Zur Gewinnung der beiden cox2 Promotor Konstrukte wurden pShuttleGL3Bcox-2pL und pShuttleGL3Bcox-2M je mit KpnI und HindIII bei 37°C über Nacht verdaut. Die E1-Shuttleplasmide pSE1, pSE1d24 und pSE1d2d24 wurden mit XhoI und NotI verdaut zur Entfernung des natürlichen E1-Promotors. Die verschiedenen DNA-Sequenzen wurden mit T4-Polymerase behandelt und anschließend ligiert. Die korrekte Ausrichtung der Promotoren im Konstrukt wurde per PCR kontrolliert. Das restliche virale Genom stammt von Pac1 verdautem pTU-5/3, bei welchem GFP und Luciferase anstelle von E1 vorliegen. Nachfolgend wurden die sechs verschiedenen pSE-Varianten mit dem linearisiertem pTU-5/3 Genom in 911 Zellen ko-transfiziert. Plaques wurden 7 bis 20 Tage nach Infektion vereinzelt und amplifiziert. Die gewonnenen Viren wurden schließlich bezüglich ihres Promotor-E1 Status, der Anwesenheit der 5/3-Fibermodifikation und des Fehlens sowohl von Wildtyp-E1 als auch GFP per PCR überprüft.

2.2 Amplifizierung der Viren (I-IV)

Die adenoviralen Vektoren und CRAbs wurden in 293- beziehungsweise A549-Zellen amplifiziert. Die Aufbereitung erfolgte dann mittels doppelter CsCl-Gradienten in standardisierter Form. Virale Partikel wurden mittels 260nm-Photometrie bestimmt. Infektiöse Partikel wurden in üblicher Weise per Plaque-Assay ermittelt

3. In vitro Experimente (I-IV)

3.1 Luciferase Assay (I)

Die verschiedenen Zelllinien wurden an Tag 1 mit 25.000 Zellen/Kammer auf 24-Kammer-Platten in 1 ml Wachstumsmedium plattiert. Am zweiten Tag erfolgte die Infektion mit 5, 50 oder 500 PFU pro Zelle für zwei Stunden in 200 µl 2% Medium auf einer elektrischen Waage. Nachfolgend wurden die Zellen einmal mit einem Milliliter PBS gewaschen und mit einem Milliliter Medium bedeckt. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 200 µl Reporter Lysis Buffer lysiert (Promega, Madison, WI) und einmal schockgefroren. 20 µl jeder Probe wurden in 100 µl Luciferase Assay Reagent (Promega, Madison, WI) gelöst und Lichtemission mit einem Berthold Lumat LB9501 gemessen. Standardisierung erfolgte, indem die Ergebnisse des CMV-Promotors für jede Zelllinie als 100% festgelegt wurden.

3.2 LacZ-Färbung (I)

Die verschiedenen Zelllinien wurden an Tag 1 mit 50.000 Zellen/Kammer auf 24-Kammer-Platten in 1 ml Wachstumsmedium plattiert. Am zweiten Tag erfolgte die Infektion mit 500 PFU pro Zelle für zwei Stunden in 200 µl 2% Medium auf einer elektrischen Waage. Nachfolgend wurden die Zellen einmal mit einem Milliliter PBS gewaschen und mit einem Milliliter Medium bedeckt. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt, und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Zellen wurden fixiert mit 0.5% Glutaraldehyd und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Die Färbung erfolgte für 2,5 Stunden mit standardisierter X-Gal Lösung (40 µl 2% X-gal, 10 µl 0.3 M Kaliumferrizyanid, 10 µl 0.3 M Kaliumferrozyanid und 940 µl PBS pro ml). Nachfolgend wurden die Zellen erneut für 10 Minuten mit PBS gewaschen und ein zweites Mal mit 10 % gepuffertem Formalin für 30 Minuten fixiert. Bilder wurden im Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung erstellt.

3.3 RT-PCR (I)

RNA der Zellen wurde mit RNeasy mini prep kit (Qiagen, Valencia, CA) extrahiert, mit Deoxyribonuclease I (Life Technologies, Rockville, MD) für 30 min behandelt und RT-PCR von je 90 ng RNA mit OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA) durchgeführt. Folgende Primer wurden verwendet:

Tabelle 5. Primer für RT-PCR

Flt-1		Publikation
vorwärts	5'-TGC TTG AAA CCG TAG CTG G-3'	I
rückwärts	5'-GGT GCC AGA ACC ACT TGA TT-3'	I
GAPDH		
vorwärts	5'-TCC CAT CAC CAT CTT CCA-3'	I
rückwärts	5'-CAT CAC GCC ACA GTT TCC-3'	I

Vorläufige serielle Verdünnungsproben dienen zur Kontrolle der linearen Amplifikation der Gene während der Versuchsreihe.

3.4 Kristallviolett Assay (II)

Die verschiedenen Zelllinien wurden an Tag 1 mit 500.000 Zellen/Kammer auf 6-Kammer-Platten in 3 ml Wachstumsmedium plattiert. Am zweiten Tag erfolgte die Infektion mit 0, 0.1, 1 or 10 VP pro Zelle für eine Stunde in 500 µl 2% Medium auf einer elektrischen Waage. Nachfolgend wurden die Zellen einmal mit zwei Milliliter PBS gewaschen und in drei Milliliter Medium mit 5 % FBS kultiviert. Das Wachstumsmedium wurde jeden Tag gewechselt. An Tag 10 (PA-1), Tag 14 (Hey, SKOV3.ip1) beziehungsweise Tag 17 (OV-4) wurde das Medium vorsichtig abgezogen und die Zellen zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen mit 10 % gepufferter Formalinlösung. Die Färbung erfolgte mit einprozentiger Kristallviolettlösung (in 70% Ethanol als Trägerlösung) für 20 Minuten in Raumtemperatur. Überschüssige Färbelösung wurde mit Leitungswasser abgewaschen, und Aufnahmen der Platten nach Trocknung erstellt (45).

3.5 Protein basierter Oncolyse Assay (II, III, IV)

Der MTS Assay wurde durchgeführt wie zuvor beschrieben (16). In Kürze: Die verschiedenen Zelllinien wurden an Tag 1 mit 15.000 Zellen/Kammer auf 96-Kammer-Platten in 100 µl Wachstumsmedium plattiert. Am zweiten Tag erfolgte die Infektion mit 0, 0.1, 1 oder 10 VP pro Zelle für eine Stunde in 50 µl 2% Medium auf einem Rüttler. Nachfolgend wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen und in 100 µl 5% Medium kultiviert, welches jeden zweiten Tag gewechselt wurde. An Tag 8 (PA-1), Tag 15 (Hey, SKOV3.ip1) bzw. Tag 16 (OV-4) wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen, die Zellen mit Reporter Lysis Buffer (Promega, Madison, WI) lysiert und einmal schockgefroren. Die Proteinkonzentration wurde mittels DC Protein Assay system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) bestimmt.

Die Zervixkazinomzelllinien Caski, Hela, SiHa and C33A wurde analog infiziert und kultiviert. An Tag 13 (SiHa and C33A) bzw. Tag 14 (Caski and Hela) wurde ein MTS assay (CellTiter96®Aqueous One Solution Reagent, Promega, Madison, WI) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Für die dreifach modifizierten CRAds erfolgte Plattierung, Infektion und weitere Kultivierung wie oben beschrieben. An Tag 7 (nHEPs), Tag 9 (A549, BT474), Tag 10 (FHS173WE), Tag 14 (SKOV3.ip1), Tag 17 (OV-4) bzw. Tag 18 (Hey and ES-2) wurde ein MTS assay (CellTiter96®Aqueous One Solution Reagent, Promega, Madison, WI) nach Herstellervorschrift durchgeführt.

3.6 Quantitative PCR (II, III, IV)

Primäre Ovarialkarzinomzellen wurde wie zuvor beschrieben von malignem Aszites gewonnen und kultiviert (43). Analyse und Kultivierung von Spheroïden aus primären Zellen erfolgte ebenfalls wie beschrieben (44). In Kürze: Aufbereitete, unpassagierte Zellen wurden über Nacht in mit 3% Agar beschichteten Zellkulturflaschen auf einer elektrischen Waage inkubiert. Die so erzeugten Spheroïde, i.e. dreidimensionale Zellstrukturen, wurden resuspendiert und direkt nachfolgend mit 1000 VP Ad5-Δ24RGD pro Zelle infiziert. Am nächsten Tag wurden die Spheroïde in 5 Aliquote von 1×10^5 Zellen geteilt und an fünf aufeinanderfolgenden Tagen weiter bearbeitet. DNA wurde mit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) extrahiert und quantitative PCR für adenovirales E1 mit Lightcycler® methodology (46) nach Herstellervorgaben durchgeführt. Zur besseren Darstellbarkeit der Negativkontrolle,

wurden Werte unter der Nachweisgrenze des Assays als „1“ gesetzt und die übrigen Werte in Relation dazu dargestellt.

Ebenfalls 10^5 Zellen pro Kammer wurden zur Bestimmung der E4-Kopienanzahl (III, IV) auf 96-Kammer Platten kultiviert und mit 0, 1 und 10 VP pro Zelle infiziert. Die Zellen von je 4 Kammern wurden an den Tagen 2, 4, 6, 8 und 10 gewonnen und schockgefroren. DNA wurde mit DNeasy Tissue Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) gewonnen und die quantitative PCR für E4 nach Herstellerangaben wie zuvor beschrieben durchgeführt (46). Die E4 Kopienanzahl wurde gegen humanes β -Aktin normalisiert.

Tabelle 6. Primer und Proben der quantitativen PCR

Adenovirales E1		Publikation
vorwärts	5'-AACCAGTTGCCGTGAGAGTTG-3'	II
rückwärts	5'-CTCGTTAAGCAAGTCCTCGATAACA-3'	II
Probe	5'-CACAGCCTGGCGACGCCCA-3'	II
Adenovirales E4		
vorwärts	5'-GGAGTGCGCCGAGACAAC-3'	III, IV
rückwärts	5'-ACTACGTCCGGCGTTCCAT-3'	III, IV
Probe	5'-TGGCATGACACTACGACCAACACGATCT-3'	III, IV
Humanes β-actin		
vorwärts	5'-TAAGTAGGCGCACAGTAGGTCTGA-3'	II, III, IV
rückwärts	5'-AAAGTGCAAAGAACACGGCTAAGT-3'	II, III, IV
Probe	5'-CAGACTCCCCATCCCAAGACCCCA-3'	II, III, IV

3.7 Oncolyse Assay für mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) (III)

An Tag 1 wurden PBMC und C33A Zellen mit 150.000 Zellen pro Kammer auf 96-Kammer Rundbodenplatten in 100 μ l aufgebracht, welches 0, 10, 100 oder 1000 VP pro Zelle enthielt. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. MTS Assay wurde an Tag 4 bzw. Tag 6 durchgeführt nach Herstellervorgaben. Die Ergebnisse sind dargestellt in Proportion zu uninfizierten Zellen.

3.8 Nachweis viraler Replikation in PBMC (III)

10⁵ PBMC/Kammer wurden kultiviert mit 5 µg/ml Phytohemagglutinin-P (PHA-P, Sigma), 100 IU/ml recombinantem humanen Interleukin 2 (IL-2, Proleukin, Chiron, Emeryville, CA) oder ohne Stimulans bei 37°C und 7% CO₂. Infektion erfolgte mit 1000 VP/Zelle Ad5-Δ24RGD, Ad5-Δ24E3 oder Ad5lucRGD. Die Zellen von je vier Kammern wurden nach 1 Stunde, 4 Tagen oder 6 Tagen gewonnen und gefroren. DNA wurde mit DNeasy Tissue Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) extrahiert und quantitative PCR für E4 wie zuvor beschrieben durchgeführt (46). E4 Kopienzahl ist normalisiert zu human β-Aktin.

3.9 Aufnahme von Tritium-markierten Thymidin in PBMC (III)

PBMC wurden in Quadruplikets mit 10⁵ Zellen/Kammer plattiert und stimuliert mit 5 µg/ml PHA-P oder 100 IU/ml IL-2. Diese wurden mit 1000 VP/Zelle Ad5-Δ24RGD, Ad5-Δ24E3 oder Ad5lucRGD in einem Gesamtvolumen von 200 µl infiziert, und nachfolgend bei 37°C und 7% CO₂ kultiviert. An Tagen 3 und 5 wurden die Zellen mit 1 µCi Tritium-markierten Thymidin (New England Nuclear, Boston, MA) 18 – 20 Stunden vor Ernte der Zellen mit einem Skatron Micro96 Harvester behandelt. Das von den Zellen aufgenommene Tritium wurde mittels Packard Matrix 9600 Beta Counter bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt in Ausschlägen pro Minute und umgewandelt in einen Stimulationsindex in Relation zu den Kammern ohne Stimulation und ohne Virus.

3.10 Bestimmung der viralen Replikation mittels TCID₅₀ (IV)

1.5x10⁴ Zellen/Kammer SKOV3.ip1 oder BT474 wurden in 96-Kammer Platten kultiviert und nach 24 Stunden mit 10 VP/Zelle infiziert. Je vier Kammern (Zellen und Überstand) wurden nach 2, 4, 6 und 8 Tagen geerntet und auf 48-Kammer Platten übertragen. Diese wurden dreimal gefroren bei -80°C und aufgetaut, bevor ein standardisierter TCID₅₀ Test mit 10⁴ Zellen/Kammer 293 Zellen mit Verdünnungen bis zu 10E-13 durchgeführt wurde. Die Ergebnisse wurde nach 10 Tagen abgelesen.

4. Präklinische, in vivo Evaluation der Viren

4.1 Therapeutisches Ovarialkarzinom-Modell (II)

Weibliche CB17 SCID Mäuse (n=11/Gruppe) wurden intraperitoneal injiziert mit 1×10^7 SKOV3.ip1 Zellen an Tag 0. An Tagen 4, 5 und 6 wurde den Mäusen ebenfalls intraperitoneal entweder 1×10^{10} oder 5×10^8 VP von Ad5- Δ 24RGD, Ad5lucRGD (nicht-replikative Kontrolle) oder reine Trägersubstanz (1 ml Opti-MEM) injiziert. Die Mäuse wurden nachfolgend täglich kontrolliert und im Falle deutlichen Leidens euthanasiert. Die Überlebenszeit wurde als Kaplan-Meier Kurve dargestellt. Mit Hilfe von LIFETEST in SAS v.8.2 wurde die Ad5- Δ 24RGD Gruppe mit den anderen Gruppen verglichen als log-rank Test. Die Daten ließen sich im Weibull-Modell als individueller Vergleich zwischen der Ad5- Δ 24RGD Gruppe und den Kontrollen darstellen als chi-Quadrat Test in SAS v.8.2 LIFEREG.

4.2 Zervixkarzinom Tiermodell (III)

Weibliche CRL.Nu/Nu Mäuse (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) (n=5/Gruppe) wurden in beiden Flanken mit 1×10^7 C33A Zellen subkutan injiziert und Tumorstadium abgewartet. Nach 21 Tagen wurden die Viren entweder intratumoral oder intravenös injiziert und die Tumorstadium wurde im weiteren Verlauf täglich bestimmt. Als Trägersubstanz der Viren dienten 200 μ l Opti-MEM. Sobald die Tumorstadium einer Maus das gesetzliche Limit überschritt, Schmerz oder Streß bei den Mäusen vorlag, wurde die gesamte Gruppe euthanasiert. Die Tumorstadium ist dargestellt als Prozentsatz der Größe am Tag der ersten Virusinjektion, welcher als 100% festgesetzt wurde. Zusätzlich dargestellt ist der Standardfehler.

4.3 Biodistribution for Ad5- Δ 24RGD (III)

C33A Tumoren wurden inokuliert in weibliche Nacktmäuse analog zu 4.2 (n=3/group). An Tag 21 wurden 5×10^{10} VP Ad5- Δ 24RGD in 200 μ l OptiMEM intravenös jeder Maus appliziert. An Tagen 1 und 7 nach Injektion wurden Leber, Milz, Nieren, Herz, Lungen und Tumoren entfernt und schockgefroren mit einem Alkohol-Trockeneis Gemisch. DNA wurde extrahiert und die Kopienzahl von E4 bestimmt wie beschrieben.

4.4 In vivo Imaging und Überleben der dreifach modifizierten CRAds (IV)

Hey Ovarialkarzinomzellen wurden subcutan in Nacktmäuse injiziert und Tumorstadium bis zu einer Größe von ca. 10 mm^3 abgewartet. Nun wurden 3×10^8 VP jedes CRAds an drei aufeinander folgenden Tagen appliziert, und die Tumorstadium im weiteren Verlauf regelmäßig gemessen. Darstellung erfolgt in Relation zur Größe am Tag der ersten Virusgabe.

Hey Ovarialkarzinomzelltumoren wurden initiiert wie zuvor. Bei einer Tumorstadium von 10 mm^3 erfolgte die gleichzeitige Gabe von 3×10^8 VP Ad5/3Luc1 (nicht replizierendes, Luciferase-expressendes Kontrollvirus) mit jedem CRAd und nach 3 Tagen wurde die Luciferase Expression in vivo gemessen. Hierzu wurden 4,5 mg d-luciferin (Promega) intraperitoneal jeder Maus verabreicht in 100 μl FBS-freiem Wachstumsmedium. Aufnahmen erfolgten durch IVIS 100 mit Living Image v. 2.50 (Xenogen inc., Alameda, CA).

SKOV3.ip1 Peritonealkarzinose wurde mit 10^7 Zellen pro Maus etabliert. Nach 7 Tagen wurden 10^8 VP Ad300wt, Ad5/3d24 oder Ad5/3Cox2Ld24 ebenfalls intraperitoneal an drei aufeinander folgenden Tagen appliziert und die Überlebenszeit der Mäuse bestimmt.

5. Statistik (II, III, IV)

Der ANOVA F-test (II) (SAS v.8.2, SAS Institute, Cary, NC) wurde durchgeführt zur Bestimmung der Unterschiede in der onkolytischen Potenz der verschiedenen Viren für die verschiedenen Virusdosen und Zelllinien. Bei unklaren Ergebnissen wurde zusätzlich der zweiseitige t-Test genutzt, um statistische Signifikanz im Vergleich zur nicht replikativen Kontrolle zu bestimmen.

Zur Analyse der Tumorgößen (III) wurde ein Modell der wiederholten Messungen mit PROC MIXED (SAS ®Ver. 8.02) genutzt. Log-Transformation erfolgte als Normalisierung. Mittels f-Test wurden die Effekte der einzelnen Behandlungsgruppen, Zeitpunkt und Dauer der Behandlung bestimmt. Die Tumorbasisgröße ist als Co-Variante in allen Modellen enthalten. Über alle Zeitpunkte wurde ein t-statistischer Mittelwert erstellt für adjustierte Differenzen. Ein beidseitiger p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant für alle Analysen angesehen.

Ein F-Test (IV) wurde angewandt zur Bestimmung der Unterschiede der onkolytischen Potenz der Viren zwischen den verschiedenen Dosen und Zelllinien. Bei unklaren Ergebnissen wurde zusätzlich der zweiseitige t-Test genutzt, um statistische Signifikanz im Vergleich zur nicht replikativen Kontrolle, zur Delta24-Chimere ohne Promotor und des Wildtyps zu bestimmen. Ein beidseitiger p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant für alle Analysen angesehen. In vivo wurden mittlere Tumorgöße und Standardabweichung für jede Gruppe und jeden Zeitpunkt bestimmt und non-parametrisch auf Signifikanz bestimmt. Proc Mixed in SAS v.6.12 (SAS Institute, Cary, NC) wurde zur Bestimmung des Effekts von Gruppe bzw. Zeit auf das Tumorwachstum paarweise genutzt.

Ergebnisse

1. Transkriptionales Targeting von Teratokarzinomzellen mit Hilfe des flt-1 Promotors (I)

Flt-1, einer der Rezeptoren des vascular endothelial growth factor (VEGF), weist eine unregulierte Expression sowohl in Tumorgefäßen als auch dem eigentlichen Tumorgewebe auf. Daher erscheint der flt-1 Promotor als möglicher Kandidat zur tumorspezifischen Transgenexpression im adenoviralen Kontext, insbesondere da er nicht von Lebergewebe oder ausgereiften Gefäßzellen exprimiert wird.

Wir konnten mittels zwei verschiedener Nachweismethoden zeigen, daß Teratokarzinomzelllinien unabhängig von ihrem originären Gewebe eine eigene endogene flt-1 Expression aufweisen, nicht jedoch Ovarialkarzinom-, Mammakarzinom- oder Zervixkarzinomzelllinien. Unsere Daten lassen es als wahrscheinlich erscheinen, daß die berichtete mRNA Expression von flt-1 in Tumorblocks von Adenokarzinomen des Ovars (47) von nicht-Karzinomzellen wie Endothelzellen der Tumorblutgefäße verursacht wurde. Ebenfalls in Kontrast zu unseren Ergebnissen ist die Veröffentlichung von Masood et al. (48), der mittels RT-PCR eine Vielzahl von Tumorzelllinien positiv für flt-1 testete, einschließlich der Ovarialkarzinomzelllinie Hey. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte im Zusammenhang mit den Zellen (z.B. Passagenummer) stehen, oder assoziiert sein mit der Sensitivität der RT-PCR.

Obwohl das Teratokarzinom ein seltener Tumor ist und für gewöhnlich mit Chemotherapie gut behandelt werden kann, sind diese Ergebnisse von Interesse, da der flt-1 Promotor aktiv ist unabhängig vom Gewebetyp, vom dem es abstammt. Wir fanden den flt-1 Promotor aktiviert sowohl in ovariellen als auch in testikulären Teratokarzinomen. Jeder Promotor, der aktivierbar bleibt nach Klonierung in das adenovirale Genom, dabei ausreichende Level von Transgenexpression erreicht und vom Phänotypus her in Lebergewebe nicht aktiv ist, ist von potentiell klinischen Nutzen. Die klare Korrelation von Transgenexpression und flt-1 mRNA in Teratokarzinomen, die wir mittels unserer Versuche zeigen konnten, läßt vermuten, daß dieser Promotor diese notwendigen Eigenschaften aufweist. Daher erscheint flt-1 als möglicher Kandidat zum transkriptionellen Targeting von Teratokarzinomen.

Der biologische Grund für die hier in Teratokarzinomzellen gefundene Aktivität des flt-1 Promoters bleibt unklar. Da Teratokarzinome von undifferenzierten, pluripotenten frühen embryonalen Zellen abstammen und sowohl Zellen des Endo-, Meso- und Ektoderms enthalten (49), könnte dieser Mangel an Differenzierung eine mögliche Begründung für Expression dieses sonst nur in reifen Endothelien aktiven Promotors darstellen. Dies wäre in Übereinstimmung mit Studien, die eine Abhängigkeit der flt-1 Expression vom Differenzierungsstatus fanden (50, 51). Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, induzierten wir eine artifizielle Differenzierung der Teratokarzinomzellen mit Retinolsäure und cAMP oder Valproinsäure (52, 53), gefolgt von einer Infektion mit Luziferase exprimierenden Viren. Obwohl wir die artifizielle Differenzierung der Zellen an Hand von Veränderungen der cmv-gesteuerten Genexpression und des mikroskopischen Aspekts der Zellen sahen, konnte keines der Experimente einen Zusammenhang zwischen flt-1 Expression und artifizieller Differenzierung zeigen. Dabei sollte jedoch beachtet werden, daß die hier genutzten Modelle nicht einem natürlichen Differenzierungsprozeß entsprechen und dementsprechend nur von eingeschränkter Aussagekraft sind.

2. Infektiosität von Ovarialkarzinomzellen mit dem konditional replikativem Adenovirus Ad5- Δ 24RGD (II)

In allen getesteten Zelllinien zeigt der Kristallviolett basierte Zellviabilitäts-Assay eine ausgeprägte Replikation und dadurch bedingte Onkolyse für Ad5- Δ 24RGD und Ad5wtRGD. In den vorliegenden Adenokarzinomlinien (Hey, SKOV3.ip1 und Ov-4) sind Replikation und Onkolyse von beiden Viren annähernd gleich, wohingegen bei der Teratokarzinomlinie PA-1 das Virus mit Wildtyp E1 (Ad5wtRGD) etwas potenter als Ad5- Δ 24RGD erscheint. Die Negativkontrolle Ad5LucRGD verursacht keinerlei Onkolyse in allen Zelllinien. Diese qualitativen Daten wurden quantitativ bestätigt mit einem Assay, der auf der tatsächlichen Proteinkonzentration beruht. Bei Infektion mit 10 VP/Zelle Ad5- Δ 24RGD fanden wir für Hey, SKOV3.ip1, PA-1 und OV-4, 11.2%, 46.2%, 73.0% und 46.7% der Zellen vital bei Versuchsende (im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle). Ähnliche Ergebnisse sahen wir bei Infektion mit der positiven Kontrolle Ad5wtRGD (13.7%, 22.7%, 28.0%, 51.9%). Somit hat Ad5- Δ 24RGD eine ähnliche onkolytische Potenz wie Viren mit Wildtyp E1.

Spheroide aus primären Ovarialkarzinomzellen stellen ein höchst realitätsnahes Modell zur Bestimmung der Replikationsstärke von CRAds dar. Außerdem sind sie eine der wenigen Möglichkeiten, primäre Karzinomzellen in Zellkultur zu halten, ohne sie klonalem Selektionsdruck durch Passagierung und Adaptation an Zellkulturbedingungen auszusetzen. Die Spheroide wurden an den Tagen 1 bis 5 nach Infektion kollektiert, und quantitative PCR zur Bestimmung der viralen Kopienzahl durchgeführt. Am ersten Tag nach Infektion mit Ad5- Δ 24RGD wurden 1,13 Viruskopien pro Zellkammer bestimmt. Diese Zahl stieg exponentiell an auf 1036 – 19.336 – 402.000 – 4.296.000 Kopien an den Tagen 2 - 3 - 4 - 5. Der Nachweis einer effektiven Replizierung von Ad5- Δ 24RGD in primären, unpassagierten Ovarialkarzinomzellen konnte somit erbracht werden.

Zusammengefaßt haben wir ein neues, replikationskompetentes Virus, Ad5- Δ 24RGD, erfolgreich an verschiedenen in vitro Modellen mit Ovarialkarzinomzellen getestet. Wir sahen ähnliche Replikation und Onkolyse dieses Agens wie bei der positiven Wildtypkontrolle (beide Viren mit erhöhter Infektiosität durch Modifikation der Virusrezeptorbindung). Zusätzlich fanden wir in einem höchst realitätsnahen Spheroidmodell mit primären Karzinomzellen eine exponentielle Zunahme der Viruskopien von Ad5- Δ 24RGD.

Somit kann Ad5- Δ 24RGD sowohl Ovarialkarzinomzelllinien als auch primäre Ovarialkarzinomzellen effektiv infizieren und sich in diesen replizieren.

3. Therapeutischer Effekt des konditional replizierenden Adenovirus Ad5- Δ 24RGD in einem orthotopen Ovarialkarzinom-Mausmodell (II)

Unter Nutzung eines etablierten Mausmodells peritonealer Karzinose nach intraperitonealer Injektion von SKOV3.ipl Zellen behandelten wir die Mäuse mit ebenfalls intraperitonealen Applikationen von 1×10^{10} VP Ad5- Δ 24RGD, dem nicht replizierenden Virus Ad5LucRGD oder reiner Trägersubstanz an drei aufeinander folgenden Tagen. Der Median des Überlebens war jeweils 64, 45 und 36 Tage. Die mittlere Überlebenszeit für Ad5LucRGD war 45,7, die für Trägersubstanz 37,6 Tage. In der statistischen Analyse mit log-rank und Chi-Quadrat Test erwies sich das Überleben der mit Ad5- Δ 24RGD behandelten Gruppe als signifikant überlegen ($P < 0.0001$).

In gleicher Weise wurde eine geringere Virusdosis (5×10^8 VP/Tag) untersucht. Der Überlebensmedian wurde für Ad5- Δ 24RGD nicht erreicht, für Ad5LucRGD betrug er 40 und für die virusfreie Kontrollgruppe 36 Tage. Die Mittelwerte betragen 41,9 beziehungsweise 37,6 Tage. Alle Mäuse der Kontrollgruppen verstarben innerhalb von 60 Tagen, wohingegen alle mit Ad5- Δ 24RGD behandelten Mäuse zumindest bis Tag 61 lebten. In der statistischen Analyse mit log-rank und Chi-Quadrat Test erwies sich auch hier das Überleben der mit Ad5- Δ 24RGD behandelten Gruppe als signifikant überlegen ($P < 0.0001$). Interessanterweise wies keine der mit Ad5- Δ 24RGD behandelten Mäuse Anhalt für eine Peritonealkarzinose auf. Statt dessen entwickelten mehrere Mäuse subkutane Tumoren im Bereich des Nadelweges der Zellinjektion, welche im zeitlichen Verlauf die Tötung der Tiere indizierte. Alle Tiere der Kontrollgruppen verstarben durch oder wurden getötet wegen intraperitonealer Tumormassen.

Wir vermuten, daß die subkutanen Tumore durch verschleppte Zellen während der Injektion entstanden sind. Ad5- Δ 24RGD hatte vermutlich auf Grund der intraperitonealen Injektion nur minimalen Zugang zu subkutanem Gewebe und konnte daher die dort sich entwickelnden Tumoren nicht eradizieren. Als Nebenbemerkung sei vermerkt, daß dies der erste Bericht über eine Heilung bzw. ein Langzeitüberleben in Mäusen mit diesem hochaggressiven Tumormodell ist.

Der niedrigeren Virusdosis von 5×10^8 VP täglich über drei Tage würden ca. 1×10^{12} VP für einen 60 kg schweren Mensch entsprechen. dl1520 wurde in einer klinischen Studie mit intraperitonealen Dosen täglich zwischen 1×10^{11} und 1×10^{13} VP an fünf aufeinander folgenden Tagen appliziert (54). Die Studie ergab, daß Patienten mit Resttumoren über 2 cm dosislimitierende Nebenwirkungen ab etwa 1×10^{12} VP über fünf Tage zeigten, während Patienten ohne größeren Tumorrest 1×10^{13} VP über fünf Tage ohne Toxizität vertrugen. Obwohl ein Datenvergleich zwischen in vivo Studien an Mäusen und klinischen Studien unzulässig ist, da sich humane Adenoviren in Mäusen nicht replizieren, lassen die Ergebnisse hier die onkolytische Potenz von Ad5- Δ 24RGD aus vielversprechend für eine klinische Anwendung erscheinen.

4. Infektiosität von Zervixkarzinomzellen mit dem konditional replikativem Adenovirus Ad5-Δ24RGD (III)

In allen vier getesteten Zervixkarzinomzelllinien zeigte der auf mitochondrialer Aktivität beruhende MTS-Zellaktivitäts-Assay Onkolyse für Ad5-Δ24RGD und Ad300wt. Nach Infektion mit 10 VP/Zelle Ad5-Δ24RGD verblieben von C33A, Caski, Hela und SiHa Zellen, 0%, 24%, 16.5% und 34% im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle vital, wohingegen bei Infektion mit 10VP/Zelle der Wildtypkontrolle 0%, 6%, 11% und 29% der Zellen vital verblieben. In vitro zeigt demnach Ad5-Δ24RGD eine ähnliche onkolytische Potenz wie das Wildtypvirus.

Ad5-Δ24RGD wurde ebenfalls mit Ad5-Δ24E3 verglichen. Dieses Virus hat die gleiche 24 Basenpaar Modifikation zur Limitierung der Replikation auf Rb-p16 mutierte Zellen wie Ad5-Δ24RGD, besitzt jedoch nicht RGD im Bindungselement, welches eine erhöhte Infektiosität des Virus unabhängig von CAR gewährleistet. Wir fanden eine ähnliche beziehungsweise erhöhte onkolytische Potenz für die hier getesteten Zervixkarzinomlinien. Dies ist vereinbar mit den Ergebnissen anderer Gruppen und unseren eigenen früheren Ergebnisse, welche eine vergleichbare replikative Stärke von CR2 mutierten und Wildtyp-Adenoviren ergab (16, 55).

5. Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC) können von Ad5-Δ24RGD infiziert, aber nicht lysiert werden (III)

Von besonderem Interesse für einen möglichen Einsatz von Ad5-Δ24RGD im Rahmen klinischer Studien ist der Effekt auf Leukozyten. Es ist bekannt, daß Adenovirus Typ 5 nur in geringem Maße PBMCs infizieren kann (56, 57), obwohl mittels hoher Virusdosen eine Transduktion durchaus möglich ist (58, 59). Bislang ist jedoch nicht untersucht, ob die RGD Modifikation zu einer erhöhten Infektiosität für PBMCs sorgt, da diese Zellen die zur RGD-vermittelten Transduktion benötigten Integrine auf ihrer Membran exprimieren (60). Das adenovirale Kapsid induziert klonale Teilung in verschiedenen PBMC-Varianten, und PBMC zeigen Migration zu adenoviral infiziertem Gewebe (58, 60, 61). Aus diesem Grunde könnte eine adenovirale Infektion von PBMC mit nachfolgender Replikation im Rahmen einer klinischen Erprobung zu potentieller hämatologischer Toxizität führen.

PBMC aus frisch gewonnenem Citratblut zeigten keine Reduktion ihrer Vitalität 4 oder 6 Tage nach Infektion mit bis zu 1000 VP/Zelle Ad5-Δ24RGD. Die als Kontrolle ebenfalls infizierten Zervixkarzinomzellen waren zu 100% lysiert an beiden

Zeitpunkten. 1000 VP/Zelle entspricht einer Viruslast von 10^{13} VP i.v. für einen erwachsenen Mensch mit 4.3×10^9 Leukozyten/Liter. Nach Chemotherapie weisen Patienten typischerweise solche Werte auf (62). Damit korrelieren 1000 VP/Zelle mit der Exposition im Rahmen einer klinischen Studie.

Um in vivo Aktivierung der PBMC zu imitieren, wurden PBMC in vitro mit Ad5- Δ 24RGD bzw. den adäquaten Kontrollen infiziert und simultan stimuliert mit rekombinantem humanen IL-2 oder PHA-P. Tritium Aufnahme diente als Proliferationsmarker. An Tag 4 wiesen sowohl mit IL-2 als auch mit PHA-P stimulierte Zellen unabhängig von einer viralen Infektion eine deutliche Proliferation auf. Allerdings expandierten die mit Ad5- Δ 24RGD infizierten Zellen minimal geringfügiger. An Tag 6 hatten diese Unterschiede zugenommen, was auf einen möglichen toxischen Effekt durch Ad5- Δ 24RGD hinweist. Zum Nachweis, ob dieser Effekt durch virale Replikation bedingt ist, wurde mittels quantitativer PCR die Anzahl der Viruskopien in stimulierten und unstimulierten Zellen bestimmt. Keiner der Viren zeigte hier nachweisbare Replikation.

Nach Infektion mit Ad5- Δ 24RGD konnten wir keine nachlassende Vitalität der PBMC verzeichnen. Die fehlende Replikation von Ad5- Δ 24RGD in PBMC war zudem unabhängig von Stimulation. Trotzdem lassen unsere Ergebnisse vermuten, daß Ad5- Δ 24RGD mit durch IL-2 oder PHA-P bedingter Stimulation interferiert. Dies war insbesondere an Tag 6 offensichtlich. Ursächlich hierfür könnte die Expression von E1 in den Zellen sein, da Ad5LucRGD keine Veränderungen bewirkte. Auch das isogenetische Kontrollvirus mit Wildtypkapsid (Ad5- Δ 24E3) zeigte keinerlei Effekte auf PBMC, was eine durch RGD bedingte erhöhte Infektivität ebenfalls für PBMC wahrscheinlich macht. Trotz der anzunehmenden Infektion von PBMC durch Ad5- Δ 24RGD konnte sich das Virus offensichtlich nicht replizieren und zur Lyse führen. Ursächlich mögen ein intakter Rb/p16 Zyklus oder andere zellspezifische Gründe sein.

Dennoch, diese Experimente wurden durchgeführt zur Erlangung erster Hinweise auf eine mögliche Toxizität, und weitere umfangreichere Studien sind eindeutig notwendig. Des weiteren ergeben vorklinische Studien zwar wichtige und interessante Datensätze, jedoch erst durch klinische Studien wird sich die Effektivität und das Sicherheitsprofil neuer Substanzen beurteilen lassen.

6. Biodistribution und Virusreplikation in vivo des konditional replikativen Adenovirus Ad5- Δ 24RGD (III)

Vor einem klinischen Test sollten die besten zur Verfügung stehenden präklinischen Assays eingesetzt werden, nicht nur um die Effektivität, sondern auch um die Sicherheit einer Substanz zu testen. Umfassende Toxizitätsstudien an Mäusen mit humanen Adenoviren sind nicht sinnvoll, da sich diese in Mäusen nicht replizieren (61). Biodistribution kann aber in Mäusen untersucht werden.

Achtzehn Stunden nach i.v. Injektion von Ad5- Δ 24RGD wurde das Virus hauptsächlich in der Leber, der Milz (35 % der Leberdosis), den Lungen (25 %) und im Tumor (14 %) gefunden, während Herz (1,8 %) und Nieren (1,4 %) kaum infiziert wurden. Das Leber-Tumor-Verhältnis der gemessenen Viruskopien betrug 7:1. An Tag 7 nach Injektion fanden wir eine 558-fache relative Zunahme der Viruslast im Tumor, eine in vivo Replikation im Tumor damit anzunehmen. Die eingesetzte Dosis war analog zu früheren Versuchen mit E1-deletierten, nicht-replikativen Viren gewählt worden, um eine direkte Vergleichsmöglichkeit zu gewähren (25). Unsere Daten zeigen deutliche Übereinstimmung mit den Vorwerten von RGD-modifizierten Viren. Wie erwartet, war die Leber das wichtigste Zielorgan der Viren nach i.v. Applikation. Im Gegensatz zur i.p. Gabe, bei der Milz und Leber eine ähnliche Virusaufnahme zeigten (25), nimmt die Milz nach i.v. Virusgabe nur 35 % der Leberdosis auf. Während die Lungen nach i.p. Gabe fast keinerlei Viruslast zeigten, gelangen 25 % der Leberdosis nach i.v. Gabe in die Lungen.

Wie zuvor erwähnt replizieren sich humane Adenoviren nicht in Mäusen (61), daher war es ein erwartetes Ergebnis, keine virale Replikation im murinen Gewebe nachweisen zu können. In der Leber fanden wir einen nichtsignifikanten 3,5-fachen Anstieg viraler DNA, welcher durch geringgradige Multiplikation der viralen DNA ohne Produktion eigentlicher Virionen bedingt sein mag.

Zur Durchführung relevanter Toxizitätsstudien ist die Entwicklung weiterer syngenetischer Modelle notwendig (61). Die Aussagefähigkeit dieser Modelle bleibt jedoch solange begrenzt, wie kein Tiermodell existiert, das die Replikation humaner Adenoviren ausreichend zulässt. Bislang veröffentlichte Daten mit syrischen Hamstern (63) und Schweinen (64) sind jedoch sehr vielversprechend und könnten eine Möglichkeit zur präklinischen Toxizitätsprüfung darstellen.

7. Therapeutische Effektivität des konditional replikativen Adenovirus Ad5-Δ24RGD in einem Zervixkarzinom-Mausmodell (III)

Der ultimative präklinische Test für experimentelle Therapeutika sind in vivo Modelle. Hier nutzten wir ein Mausmodell zur Nachahmung lokaler Zervixkarzinometastasen, die einer direkten Injektion zugänglich sein könnten. C33A Tumoren wurden subkutan etabliert, und die Mäuse in gleiche 6 Gruppen eingeteilt. Die Gruppen erhielten drei aufeinander folgende intratumorale Dosen von entweder 10^7 , 10^8 , 10^9 oder 10^{10} VP Ad5-Δ24RGD, 10^{10} VP des E1-deletierten Virus Ad5lucRGD oder reine Trägersubstanz (mock) in 200 µl OptiMEM. Die beiden letztgenannten Behandlungsmethoden zeigten keinerlei Einfluß auf das Tumorstadium. Ad5-Δ24RGD führte im Vergleich zu mock und Ad5LucRGD sowohl mit 10^{10} ($p < 0.0001$ für beide) als auch mit 10^9 VP ($p < 0.0001$ versus Ad5lucRGD und $p = 0.0004$ versus mock) zu einem signifikanten Rückgang des Tumorstadiums mit zeitweiliger Rückentwicklung und folgendem Stagnationsstillstand. 10^8 VP war ebenfalls in seiner Wirkung signifikant ($p = 0.0002$ versus Ad5lucRGD und $p = 0.0190$ versus mock). Interessanterweise ergab sogar die geringste Dosis einen therapeutischen Effekt in diesem aggressiven Tumormodell, wobei die höheren Dosen jedoch effektiver waren. Vergleicht man Gewicht von Mensch und Maus, so entsprechen 10^7 VP der Maus ungefähr 2×10^{10} VP für einen Menschen. Dies ist deutlich unter den 1×10^{13} VP, die vom einem anderem CRAd (CV706) in einer klinischen Phase I Studie intratumoral injiziert wurden, ohne dosislimitierende Nebenwirkungen aufzuweisen (65).

Metastasiert-disseminierte Zervixkarzinome stellen klinisch die größte therapeutische Herausforderung dieses Tumortyps dar. Hier ist eine systemische Applikation notwendig. Daher testeten wir Ad5-Δ24RGD auch mit i.v. Injektionen bei Mäusen mit multiplen subkutanen Tumoren. Die Mäuse erhielten entweder eine Einzeldosis von 10^{10} VP, drei Dosen von 3×10^{10} VP oder eine Einzeldosis von 10^{11} VP Ad5-Δ24RGD intravenös verabreicht. Als Kontrollen dienten eine einmalige Injektion von 10^{11} VP Ad5lucRGD oder von reiner Trägersubstanz.

Intravenöse Injektion von 10^{10} VP Ad5-Δ24RGD führte zu einer zwar signifikanten, jedoch nur minimalen Reduktion der Tumorstadiumgröße ($P = 0.0002$ versus Ad5lucRGD und $p = 0,0125$ versus mock). Dies steht in Einklang mit früheren Studien, in welchen $1-2 \times 10^{10}$ VP als Leberdosis definiert wurden. Diese Virusmengen werden von den Kupffer

Zellen der Leber zurückgehalten (25, 66, 67). In anderen Worten, lediglich dies übersteigende Virusdosen führen zu einer effektiven Viruszirkulation im Blut.

Dazu passend resultierten 10^{11} VP in einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums, unabhängig, ob als Einzeldosis oder dreigeteilt. Die Dreifachgabe zeigte einen ausgeprägteren therapeutischen Effekt gegenüber mock, Ad5lucRGD oder der niedrigen Einzeldosis (alle $p < 0,0001$), allerdings waren die Signifikanzen der Einmalgabe von 10^{11} VP gegenüber den Kontrollen identisch. Wir fanden keinen Unterschied in der Effektivität zwischen der Dreifach- und der höheren Einfachapplikation ($p = 0,3681$). Wir konnten somit einen deutlichen therapeutischen Benefit in diesem Modell erzielen.

In Gesamtschau zeigen diese Daten, daß Ad5- $\Delta 24$ RGD auch bei intravenöser Gabe erfolgreich in vivo Tumorzellen infizieren, sich in diesen replizieren und schließlich diese lysieren kann. Ebenso sahen wir keine visuelle Evidenz für Toxizität, sei es bei intratumoraler oder intravenöser Gabe.

8. Effekt der Kombination von Promotor und Deletion auf die Selektivität und Effektivität von konditional replikativen Adenoviren (IV)

Wir klonierten sechs neue Viren unter der Kontrolle des *cox2* Promotors, je drei mit einer längeren und drei mit einer kürzeren Variante des Promotors (28, 68). Beide Promotorvarianten haben sich in früheren Studien als nützlich zur Gentherapie des Ovarialkarzinoms erwiesen (69, 70). *Cox2* wird allgemein als geeigneter tumorspezifischer Promotor (TSP) angesehen, da er eine relativ geringe Expression in Lebergewebe, jedoch eine hohe Expression in vielen Tumortypen inklusive des Ovarialkarzinoms aufweist (68-71). Drei verschiedene Varianten des zentralen adenoviralen Replikationsregulatorgens E1A wurden verwendet: Wildtyp E1, eine Delta24-modifizierte Version (24 bp Deletion in der Retinoblastombindungsstelle von E1A) oder als Delta2-Delta24-modifizierte Version (zusätzliche 3 bp Deletion – kodierend für die zweite Aminosäure von E1A, welche die p300 Bindungsstelle darstellt (72)). Sowohl Spezifität als auch Effektivität der Delta24-modifizierten Viren wurde früher schon nachgewiesen (16, 72-75). Theoretisch sollte die zusätzliche Deletion in E1A mit dadurch erhöhter Kontrolle von E1 zu einer höheren Spezifität mit größerem therapeutischen Fenster führen (Unterschied der Replikationsstärke zwischen normalen und Karzinomzellen). Eine frühere Publikation konnte eine erhöhte Spezifität durch die Delta2-Mutation für das Zervixkarzinom nachweisen

(76). Alle sechs neuen Viren sind in ihrer Infektiosität erhöht durch eine Chimärenbildung aus Adenovirus Typ 3 fiber knob sowie Adenovirus Typ 5 fiber shaft und Kapsel. Sie stellt die aktuell beste Methode des transduktionellen Targetings für Ovarialkarzinomzellen dar (25, 26, 73, 75).

Nicht alle adenoviralen Serotypen binden an CAR und haben damit einen unterschiedlichen Tropismus. Die zuvor beschriebene Chimärenbildung bei Adenoviren ersetzt Fiber und / oder Knob mit dem entsprechenden Element eines anderen Serotyps (73, 77-79). Der Rezeptor des Adenovirus Typ 3 ist bislang unbekannt. Während einige Publikationen CD46 als Ad3 Rezeptor angeben (80), sehen andere Autoren CD46 als Rezeptor für Gruppe B Adenoviren mit Ausnahme von Ad3 an (81, 82).

Unabhängig von dieser Diskussion erhöhen Ad5/3 Chimären den Gentransfer zu Ovarialkarzinomzelllinien und primären Ovarialkarzinomzellen bis zu 291-fach (26). Wichtig ist ebenfalls, daß Biodistribution und Toxizität im Mausmodell für die Chimären wie für RGD-modifizierte Viren nicht signifikant von Wildtyp Adenovirus 5 abweicht, welches sich in klinischen Studien als sicher erwiesen hatte (2).

Zwei Varianten des cox2 Promotors wurden in dieser Studie verglichen: eine längere Variante (cox2L, 1554 bp), die als spezifischer gilt, und eine mittlere Variante (cox2M, 988 bp), die eine stärkere Genexpression bewirkt (28, 68). In unseren Händen zeigten beide Promotoren ähnliche Ergebnisse, wobei sich cox2L jedoch als geringfügig spezifischer, insbesondere im Zusammenhang mit Wildtyp E1A, erwies. In Tumorzellen fanden wir keine signifikanten Differenzen zwischen beiden Promotoren, obwohl eine gewisse Tendenz des cox2M Promotors bestand, zu einer minimal erhöhten Zelltodrate in Kombination mit Wildtyp E1 oder Delta2-Delta24 zu führen.

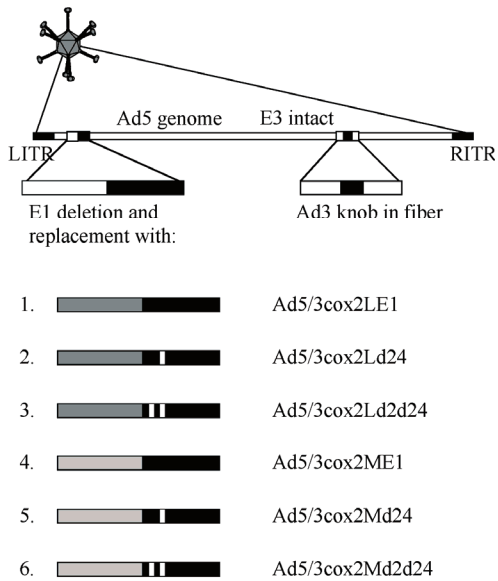


Abb. 2: Schematische Darstellung der sechs verschiedenen dreifach-modifizierten selektiven onkolytischen Adenoviren

Im Vergleich der verschiedenen E1-Mutationen, erbrachte delta-24 die positivsten Ergebnisse. Die Onkolyseraten waren höher (cox2L) oder gleichwertig (cox2M) verglichen zu Wildtyp E1. Die Überlegenheit der delta-24 Mutation war schon in früheren Studien von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen worden (16, 55). Die durch delta-2-delta-24 verursachte Onkolyse war im Schnitt zehnmal geringer im Vergleich mit den beiden anderen E1-Mutationen. Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur, die einen längeren und langsameren Replikationszyklus bei mehrfach modifizierten Adenoviren beschreibt (76, 83). Hervorzuheben ist, daß wir im Zusammenhang mit Ovarialkarzinomzellen keine Zunahme der Spezifität für die zusätzliche delta-2 Mutation neben der delta-24 Mutation finden konnten. Daher scheint ein doppelt modifiziertes E1 keinen zusätzlichen therapeutischen Gewinn über Delta-24 beim Ovarialkarzinom zu bewirken.

Die Spezifität von heterologen Promotoren ist beeinflusst durch virale Elemente wie z.B. die gedrehten, terminalen Wiederholungen (inverted terminal repeats – ITR). Daher ist es wichtig hervorzuheben, daß die Spezifität des cox2 Promotors erhalten werden konnte: in der niedrig cox2 exprimierenden Zelllinie BT474 war die Replikation um den Faktor 100 im Vergleich zum Wildtyp verringert. Im Gegensatz

dazu war die Replikation in der cox2 positiven Zelllinie A549 absolut gleichwertig zum Wildtyp mit der Ausnahme des doppelt modifizierten delta-2-delta-24, welches als cox2 minimal langsamer replizierte. A549 Zellen exprimieren CAR in hoher Konzentration (84), womit diese Zelllinie den Vergleich der chimären CRAds mit dem Wildtyp erlaubt, da alle Viren ähnlich effektiv die Zellen infizieren.

Ovarialkarzinomzellen wurden als refraktär für Infektion mit Adenovirus Typ 5 Viren beschrieben. Daher wählten wir ein transduktionales Targeting unter Nutzung des Knobs von Serotyp 3 für unsere neuen CRAds. In den Zelllinien OV-4 und SKOV3.ipl führt Adenovirus 5 Wildtyp nur zu minimaler Onkolyse, während die 5/3 CRAds eine bis zu 1000-fach höhere Effektivität in Infektion und Zellyse zeigten. Dies ist bedingt durch die starke Expression des Adenovirus 3 Rezeptor auf diesen Zellen (26). Da dieser Nachweis direkt über Bindungs- und Hemmungssassays erfolgte, ist das Ergebnis unabhängig von der anhaltenden Diskussion über die Beschaffenheit des Rezeptors für Adenovirus Typ 3. CD46 wird von einigen als Ad3 Rezeptor angesehen (80), wohingegen andere CD46 als Rezeptor für Gruppe-B Adenoviren mit Ausnahme von Ad3 beschreiben (81, 82).

In den Ovarialkarzinomzelllinien Hey und ES-2 war die Zellyse mit den 5/3 CRAds um den Faktor 10 erhöht. Gleiches galt für die Fibroblastenzelllinie FHS173WE. Sie exprimiert kein CAR auf ihrer Oberfläche, scheint aber Adenovirus Typ 3 Rezeptoren aufzuweisen, da Viren mit Serotyp 3 Knob die Zellen infizieren können. Mit Inkubationszeiten entsprechend denen der Karzinomlinien fanden wir keine Zellyse der Fibroblasten. Mit längeren Inkubationszeiten wurde eine Zellyse jedoch auch in diesen Zellen evident. Um dies weiter zu untersuchen, testeten wir die verschiedenen Fibroblastenlinien auf ihre cox2 Expression ebenso wie die mögliche Induktion einer cox2 Expression bedingt durch die Virusinfektion selber. Obwohl diese Ergebnisse schwer in Bezug auf mögliche Toxizität zu bewerten sind, da Fibroblasten in vivo nicht replizieren (was jedoch in vitro geschieht), ist dies unserer Ansicht nach ein brauchbares Modell zur Determinierung möglicher Toxizitätsunterschiede der CRAds.

Interessanterweise replizierten alle 5/3 CRAds in der Fibroblastenlinie FHS173WE. Durch den cox2 Promotor wurde die Virusselektivität jedoch signifikant erhöht im Vergleich zu Ad5/3d24 ($p < 0,01$ bei Infektion mit 1 VP/Zelle) mit einem 10-fachen Unterschied in Zellyse.

Zusätzlich konnten wir zeigen, daß *cox2* Promotor gesteuerte CRAds im Vergleich zur isogenetischen Kontrolle Ad5/3d24 eine vergleichbare und teilweise leicht erhöhte Aktivität in Tumorzellen aufweist. Dies ist wahrscheinlich durch die erhöhte Menge von zelltoxischen E1A in der Zelle bedingt, welches promotorgesteuert exprimiert wird. Dies könnte die Virusreplikation verstärken, oder die stärkere Zytolyse ist durch den Antitumoreffekt des E1A Proteins per se erzeugt (85). In nichtreplizierenden Fibroblasten war die Replikation der *cox2* gesteuerten CRAds reduziert und keines der getesteten Viren lysierte humane mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC). Dies könnte einen interessanten Sicherheitsaspekt darstellen (86).

Die Leber stellt ein Schlüsselorgan in Bezug auf mögliche Toxizität bei adenoviraler Gentherapie dar (87). Daher untersuchten wir ebenfalls primäre humane Hepatozyten auf virale Replikation. Keines der hier getesteten *cox2* gesteuerten CRAds replizierte in diesen Zellen, was eine zumindest 100-fache Differenz in Replikation im Vergleich zum Wildtyp Virus bedeutet. Dies spricht für eine potentiell geringe Lebertoxizität. Außer Hepatozyten ist die Leber aber unter anderem auch aus endothelialen Zellen und spezialisierten Makrophagen, sogenannten Kupffer-Zellen, aufgebaut. Da des weiteren die dreidimensionale Struktur der Leber eine wichtige Rolle in Bezug auf adenoviralen Gentransfer bedeuten könnte, sind klinische Testreihen notwendig, um zuverlässige Daten zur Toxizität zu gewinnen.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten eine deutlich erhöhte Spezifität und Effektivität von Viren, die eine Kombination von *cox2* Promotor und *delta24* Mutation aufweisen, im Vergleich mit nicht modifizierten Wildtyp Viren. Des weiteren erscheinen CRAds mit der *delta24* Mutation denen mit der *delta2delta24* Doppelmutation überlegen zu sein, da sie bei vergleichbarer Spezifität effektiver in Ovarialkarzinomzellen replizieren. Ebenso ist Ad5/3*cox2Ld24* stärker onkolytisch als Ad5/3*cox2E1* oder Ad5/3d24. Kombiniert man die *in vitro* Daten in Ovarialkarzinomzellen (*cox2 delta24* 100-mal effektiver) mit den Daten der Hepatozyten (Ad5wt 100- bis 1000-fach toxischer), erhält man für Ad5/3*cox2Ld24* ein um 10.000- bis 100.000-fach größeres therapeutisches Fenster im Vergleich zu Ad5 Wildtyp. *Cox2L* erwies sich außerdem in unserer Studie als spezifischer im Vergleich zu *cox2M*. Damit erscheint Ad5/3*cox2Ld24* als Virus der Wahl zu weiteren Studien, auch in Hinblick auf mögliche spätere klinische Studien.

9. Therapeutische Effektivität ausgewählter dreifach-modifizierter selektiv onkolytischer Adenoviren in vivo (IV)

Die ultimative präklinische Evaluation experimenteller Therapeutika stellen in vivo Modelle dar. Hier wandten wir ein Mausmodell an, das lokale Metastasen eines fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms widerspiegelt. Ovarialkarzinom-Xenographen wurden subkutan etabliert und direkt intratumoral die Viren injiziert. Ad5/3cox2Ld24 zeigte hier stärkeren antitumoralen Effekt als die Positivkontrolle Ad300wt ($p=0,0001$), and war signifikant effektiver als die Negativkontrolle Ad5LacZ ($p<0,01$) und mock ($p<0,001$). Ad5/3d24 war Ad5/3cox2Ld24 vergleichbar ($p=0,4$). Ad5/3cox2Ld2d24 und Ad5/3cox2LE1 zeigten in diesem hochaggressiven Modell keine bessere Effektivität als die Negativkontrollen (p nicht signifikant).

Um die Replikation der Viren in vivo zu studieren, führten wir eine Koinfektion der CRAds mit einem Luciferase-exprimierenden, nicht replikationskompetenten Virus (Ad5/3luc1) durch. Dieses Virus kann sich nur in Anwesenheit von durch CRAd-Replikation erzeugtem E1 replizieren. Im direkten Vergleich mit Tumoren, welche mit einer nichtreplikativen Kontrolle koinfiziert wurden, wiesen die Tumoren nach Koinfektion mit den CRAds eine signifikant erhöhte Luciferase-Expression auf ($p<0,01$ für alle CRAds).

Als orthotopes Modell für ein weit fortgeschrittenes Ovarialkarzinom etablierten wir SKOV3.ipl Tumormetastasen intraperitoneal mit 10^7 Zellen/Maus. Nach 7 Tagen wurden den Mäusen ebenfalls intraperitoneal an drei aufeinander folgenden Tagen entweder 10^8 VP/Tag oder reine Trägersubstanz (mock) injiziert. Nach 90 Tagen wiesen Ad300wt ($p=0,002$), Ad5/3cox2Ld24 ($p<0,001$) und Ad5/3d24 ($p<0,001$) ein signifikant verlängertes Überleben im Vergleich zur mock-Gruppe auf. Auch hatten Ad5/3cox2Ld24 ($p=0,120$) und Ad5/3d24 ($p=0,148$) einen stärkeren antitumoralen Effekt als die Positivkontrolle Ad300wt, obwohl dies nicht signifikant war zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung. Ad5/3cox2Ld24 und Ad5/3d24 zeigten vergleichbare Effektivität ($p=0,971$).

Auch hier erscheint cox2L-delta24 als Virus der Wahl für weitergehende Studien. Ähnlich wie Ad5/3d24, welches derzeit für eine klinische Studie in Finnland vorbereitet wird, könnte Ad5/3cox2Ld24 später klinisch erprobt werden.

Diskussion

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache in Europa nach kardiovaskulären Erkrankungen und begründet derzeit ca. ein Viertel aller jährlichen Todesfälle. Während bei jüngeren Frauen das Zervixkarzinom relativ häufig auftritt, nimmt die Inzidenz von Ovarial- und Endometriumkarzinomen mit steigendem Alter der Patientin zu. Trotz vielfältiger Innovationen in Therapiekonzepten und –modalitäten, konnte hier insbesondere für fortgeschrittene Stadien das statistische Überleben nur geringfügig gesteigert werden (88, 89).

Für operable Patientinnen stellt die Operation den Grundpfeiler gynäkologischer Therapie dar; Gewinnung und Sicherung der Histologie, adäquates Staging und bestmögliche Zytoreduktion sind hier die Ziele. Daher stellt die vollständige Entfernung allen tumorösen Gewebes eine Grundvoraussetzung zur Chance eines kurativen Ansatzes für fast alle gynäkologischen Tumorentitäten dar. Ausnahme hiervon sind jährlich wenige Zervix- oder Endometriumkarzinome, die effektiv mit einer kombinierten Radiochemotherapie alleine behandelt werden können. Verbesserte Anästhesieverfahren, welche aufwändige Operationen auch an Patientinnen mit reduziertem Allgemeinzustand erlauben, und moderne Operationsverfahren ermöglichen heute mehr Patientinnen, sich einer kurativen Operation zu unterziehen (90).

Innovationen der Radiatio haben mit verbesserten Strahlenquellen, der computergestützten dreidimensionalen Strahlungsplanung vor Therapiebeginn, ebenso wie fortschrittlichere Chemotherapien mit verbesserten Regimen oder modernen Medikamenten das Outcome von Patientinnen mit gynäkologischen Karzinomen deutlich verbessert (91, 92). Hocheffektive Therapiekombinationen (91, 92) und verschiedene Applikationsrouten wie z.B. in Studien die intraperitoneale Chemotherapie haben zusätzlich die Chancen beim Ovarialkarzinom verbessert (93-95).

Im Zusammenschluß verbesserten sich so sowohl das krankheitsfreie als auch das Gesamtüberleben bei Patientinnen in frühen Stadien, wohingegen Frauen mit metastasierter Erkrankung meist nur palliativ behandelt werden konnten (89). Gerichtete Therapieansätze könnten hier einen Lösungsansatz darstellen, obwohl in

Abwesenheit eines ubiquitären Onkogens, einfach-gerichtete Ansätze wohl keinen signifikanten Benefit erreichen werden (96).

In den letzten Dekaden haben enorme Anstrengungen der Basiswissenschaften dazu geführt, Krebs als Erkrankung mutierter Gene anzusehen. Insbesondere epigenetische und genetische Alterationen von Tumorsuppressor- und von Onkogenen scheinen ursächlich in der Entstehung von Karzinomen zu sein. Diese Veränderungen können hereditären Ursprungs sein, oder – deutlich häufiger – während der individuellen Lebenszeit eintreten. Eine logische Schlußfolgerung ist ein Therapieansatz mit dem Ziel, diese molekularen Defekte zu korrigieren. Ebenso könnten diese Unterschiede zur Steuerung eines antitumoralen Effekts gegen maligne Zellen genutzt werden. Damit basieren die molekularen Therapien auf der Detektion ebendieser Defekte in Tumorzellen, welche sie vom normalen Gewebe unterscheiden (82, 97, 98). Die Gentherapie beinhaltet eine Vielzahl unterschiedlicher Ansätze, deren gemeinsame Grundlage der Transfer von Genen oder genetischem Material darstellt, die nachfolgend für ein bestimmtes Protein kodieren oder als komplettes Virus den antitumoralen Effekt vermitteln (99-101).

Der Gentransfer erfolgt mittels verschiedener Vektorsysteme mit distinkten Vorzügen und Nachteilen. Durch unterschiedliche Spezifikationen eignen sich diese Vektorsysteme entweder eher zur Therapie monogenetischer Erkrankungen, erworbener Erkrankungen oder von Karzinomen. Während die Therapie der beiden erstgenannten typischerweise von einer langfristigen Genexpression und somit stabilen, nicht-immunogenen Gentransfermethode profitiert, ist für die Gentherapie von Karzinomen eine effektive und ausgeprägte Transduktion der Zielzellen essentiell. Derzeit werden hauptsächlich Adenoviren (Ad), Retroviren einschließlich der Lentiviren, adeno-assoziierte Viren (AAV) und nichtvirale Gentransfersysteme eingesetzt.

1. Methoden der Karzinomgentherapie

Gentherapie für Karzinome kann zumindest in sechs unterschiedliche Kategorien eingeteilt werden: 1) Kompensation von Mutationen, 2) molekulare Chemotherapie, 3) genetische Immunpotenzierung, 4) genetische Modulation von Resistenz/Sensitivität, 5) onkolytische (conditional replizierende) Viren und 6) antiangiogenetische Gentherapie. Ziel der Mutationskompensation ist die Korrektur

schwerwiegender molekularer Veränderungen innerhalb der Krebszelle. Beispiele seien hier die Mutation der Tumorsuppressorgene p53 oder BRCA1, sowie die Überexpression von Onkogenen wie erbB-2 (102, 103) (Abb. 3). Molekulare Chemotherapie, auch bekannt als Suizidgen- oder prodrug-conversion Gentherapie, bedeutet die selektive Expression von prodrug-aktivierenden Enzymen innerhalb der Ziel- bzw. Tumorzelle mit dem Ziel der Eradikation (Abb. 4). Klinische Studien nutzten Vektoren, welche entweder die Herpes simplex Thymidinkinase (HSV-TK) oder die Echerichia coli Cytosindeaminase (E. coli CD) übertrugen. Diese wandelten nachfolgend entweder Ganciclovir (HSV-TK) oder 5-Fluorouracil (E. coli CD) in potente Zellgifte um. Eine zusätzliche laterale Diffusion des aktiven Zellgiftes in nicht-transduzierte Nachbarzellen oder eine Signalübermittlung zwischen den Zellen zur Einleitung der Apoptose führt zu zusätzlicher Zytolyse, welche als „bystander-effect“ beschrieben wird. Daher ist bei diesem Ansatz die Transduktion aller Zielzellen nicht erforderlich (104).

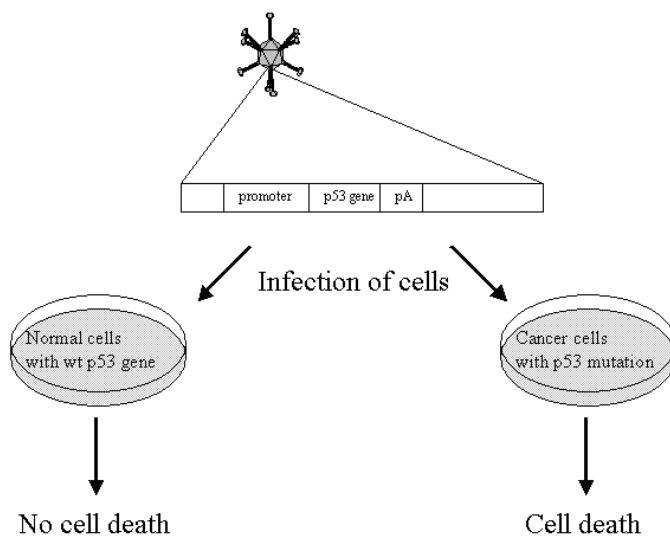


Abb. 3: Mutationskompensation: Expression eines Wildtyp p53 Gens in Zellen mit mutierter Kopie dieses Gens führt zu Zelltod in solchen Zellen mit zuvor mutiertem Gen

Im Gegensatz hierzu, involvieren Ansätze zur genetischen Immunpotenzierung die Modifizierung entweder von Immun- oder Tumorzellen zur verbesserten immunologischen Erkennung der neoplastischen zellen (105) (Abb. 5). In einer randomisierten Phase-III-Studie an Patienten mit Nierenzellkarzinomen steigerte eine autologe Nierenzelltumorvakzine das progressionsfreie 70-Monate-Überleben von 59% auf 72% Die Impfung wurde gut vertragen, und lediglich bei 12 von 379 Patienten traten schwerwiegende Nebenwirkungen auf (106).

In einem weiteren Ansatz wurde eine Vielzahl von Strategien zur Modifizierung der Sensitivität oder Resistenz gegenüber Chemotherapie oder Bestrahlung untersucht mit dem Ziel eines erhöhten therapeutischen Index (107, 108).

Onkolytische Adenoviren, auch bekannt als conditional replizierende Adenoviren (CRAds), nutzen tumorspezifische Veränderungen in der Zelle, um eine gezielte Replikation mit nachfolgender Lyse der Zielzelle zu steuern.

Die antiangiogenetische Gentherapie schließlich zielt auf die Behinderung der Ausbildung neuer Gefäße in Tumorgewebe ab und verhindert so Tumorwachstum.

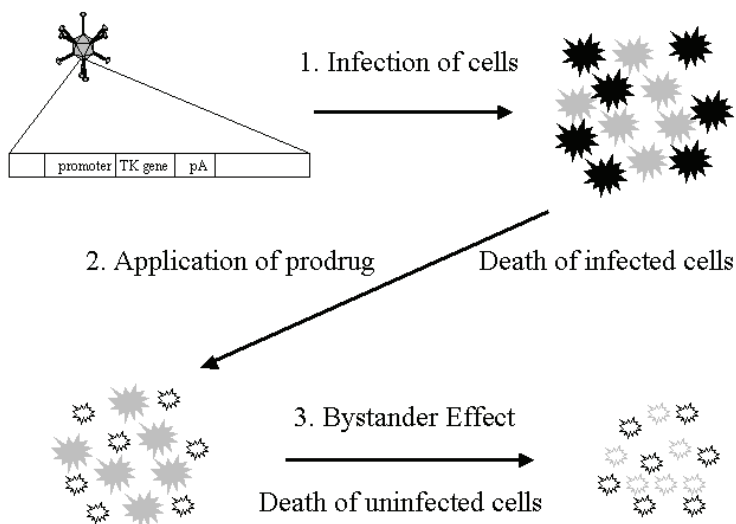


Abb. 4: Suizidgenetherapie: Nach Transfektion der Zelle mit einem Vektor für HSV-TK bewirkt die Gabe von Ganciclovir den Zelltod infizierter Zellen. Der sogenannte Bystander-Effekt führt zur Zerstörung ebenfalls umliegender Zellen.

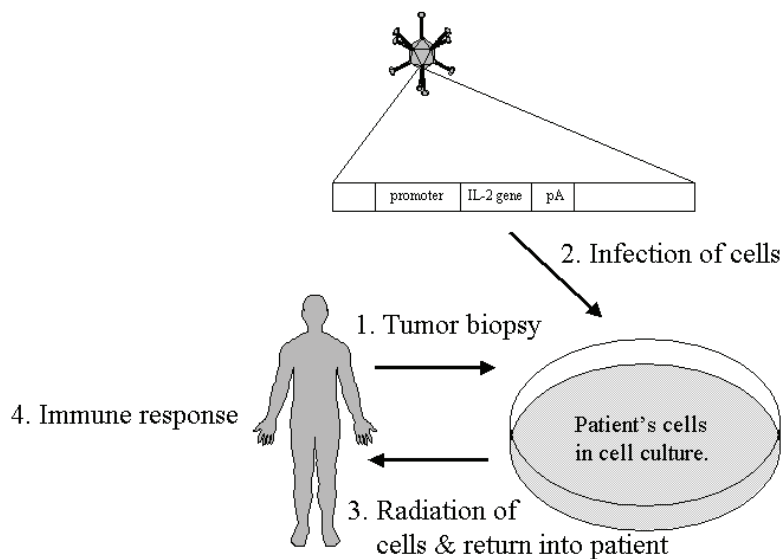


Abb. 5: Immunopotenzierung: Patienteneigene Zellen werden gewonnen und in vitro mit einem Interleukin-codierenden Vektor infiziert. Anschließend werden die transfizierten Zellen refundiert und lösen eine Immunreaktion gegen den Tumor aus

2. Gentransfermethoden

Traditionell wird das Retrovirus zum Gentransfer eingesetzt, welches sich in das Genom der Zielzelle integriert und damit zu einer langfristigen Genexpression führt. Dies bedingt aber auch einen der Hauptnachteile, da diese Integration eine Mutation oder Onkogenese auslösen kann. Des Weiteren ist die Transduktionseffizienz relativ gering, hohe Dosen sind schwer herzustellen und es erfolgt lediglich eine Infektion teilender Zellen (109-111). Dies macht Retroviren mehrheitlich zur Therapie solcher Erkrankungen attraktiv, die einer langfristigen Genexpression bedürfen. Lentiviren könnten einige dieser Probleme lösen, jedoch sind klinische Sicherheit und Effektivität noch nicht hinreichend nachgewiesen. Adeno-assoziierte Viren sind nicht-pathogene, einsträngige DNA Viren, welche als Wildtype in Chromosom 19 integrieren und zu einer langfristigen Genexpression führen, während Rekombinanten mehrheitlich episomal verbleiben (112). Erste präklinische Studien erbrachten vielversprechende Ergebnisse (113). Andererseits scheint das adeno-assoziierte Virus jedoch auch ursächlich für Deletionen oder Veränderungen in Chromosom 19 zu sein (114). Nicht-virale Vektorsysteme sind kationische Komplexe

mit dem Transgen innerhalb der Lipiddoppelmembran, welches modifiziert werden kann zur selektiven Bindung an spezifische Zielrezeptoren. Liposome werden via Endozytose in die Zielzelle aufgenommen und entlassen nachfolgend ihre DNA-Ladung in die Zelle. Zur Therapie von Karzinomen erscheinen Liposomen bislang wenig geeignet bedingt durch ihre geringe Transduktionseffizienz. Ausgeprägter noch in vivo, wurde dies auch in klinischen Studien aufgezeigt (85, 97, 99, 115-118).

3.1 Adenoviren in der Gentherapie

Adenoviren sind Doppelstrang-DNA Viren bestehend aus den Hauptkomponenten Hexon, Penton und Fiber. Die adenovirale Infektion wird vermittelt durch die knob Region am carboxy-terminalen Ende des Fibers und ihren korrespondierenden Rezeptor, des Coxsackie-Adenovirus Rezeptor (CAR) für die meisten Serotypen. Im Anschluß an die Rezeptorbindung folgen Interaktionen zwischen zellulären Integrinen und dem Arginin-Glyzin-Aspartam Motiv der Pentonbasis. Es kommt zur Ausbildung von Endosomen mit nachfolgender Internalisation des Virus. Durch einen pH-Wechsel im Endosom wird das Virus aus dem Endosom frei gesetzt und ein Dynein-/Dynaktin- abhängiger DNA-Transport im Zytoplasma zum Zellkern entlang der Mikrotubuli beginnt. Schließlich bindet die adenovirale DNA an den Core-Komplex Rezeptor des Zellkerns, wird in den Nukleus importiert und die adenovirale Proteinsynthese oder, im Falle von nicht replikationskompetenten Adenoviren, die Transgenexpression beginnt (119). Zum Ende des adenoviralen Replikationszyklus wird die Zelle lysiert und die neugebildeten Virionen freigesetzt. Die adenovirale DNA wird regelhaft nicht in das Genom der Zielzelle integriert, was ein niedriges Risiko zur Mutagenese bedingt. Dementsprechend ist das Adenovirus mit seiner zeitlich begrenzten Genexpression durch die Zielzelle weniger geeignet für Therapien, bei denen eine langfristige Expression gewünscht wird. Für Krebsgentherapieansätze ist es jedoch favorisiert, da hier typischerweise eine Zerstörung der Zielzelle gewünscht wird. Die adenovirale Infektion ist nicht abhängig von der Zellzyklusphase; ruhende und teilende Zellen werden infiziert.

Ein besonders ansprechendes Merkmal der adenoviralen Krebsgentherapie ist seine immense Kapazität im Gentransfer und in der Genexpression in vivo. Auch ist die Produktion hoher Virustiter in cGMP-Qualität, notwendig zur Durchführung klinischer Tests, gut etabliert. Die adenovirale Infektion von Gewebe ist hauptsächlich abhängig von der CAR-Expression (3-9, 120-126). Der natürliche Tropismus intravaskulärer

Adenoviren führt zu einer Akkumulation der Viren hauptsächlich in der Leber, der Milz, Herz, Lungen und Nieren (127-131). Gewebemakrophagen, wie die Kuppferzellen der Leber, spielen die Hauptrolle in der Eliminierung von Adenoviren aus dem Blutkreislauf. Und obwohl CAR ubiquitär von fast allen epithelialen Geweben exprimiert wird, wurde ein Mangel an oder eine Minderregulierung von CAR für viele Tumorgewebe berichtet. Dies könnte im Zusammenhang mit Tumoraggressivität stehen und ein verbreitetes Phänomen sein (3-14, 19, 126, 132-136). Vorläufige Ergebnisse suggerieren einen Zusammenhang zwischen CAR-Funktion und Zelladhäsion. Vermutet wird ein Tumor-supprimierender Effekt (7, 8), da CAR eine der transmembranösen Komponenten der tight junctions sein könnte (125). Überdies wurde eine inverse Korrelation von CAR-Expression und Tumorstadium gefunden (7, 137). Die Überaktivität des RAS-MAPK pathways, anzutreffen in vielen oder gar den meisten Tumoren, könnte ebenso für eine Minderung von CAR verantwortlich sein (137).

Der weitgefächerte Tropismus von Adenoviren lässt eine Steuerung der Infektion gegen Tumorgewebe sinnvoll erscheinen. Hier gibt es zwei prinzipielle Ansätze: a) transkriptionales Targeting und b) transduktionales Targeting. Transkriptionales Targeting ist die genetische Limitation der Expression des nachgeschalteten Gens auf bestimmte Zelltypen durch Vorschaltung von Promotersequenzen von Genen, die im Zielgewebe überexprimiert sind (138, 139, 140). Diese regulierenden Sequenzen werden als Tumor-spezifische Promotoren (TSP) bezeichnet {Binley, 1999 #283}. Gene unter Kontrolle einer TSP werden bevorzugt in solchen Geweben exprimiert, die den TSP aktivieren können (141).

Transduktionales Targeting beinhaltet die chemische oder genetische Modifikation des Adenovirus zum Wechsel seines Tropismus vom natürlichen Rezeptor CAR zu einem anderen Bindungselement, das bevorzugt von den Zielzellen exprimiert wird. Eine ideale Targetingstrategie würde aus Blockade der CAR-Bindung und gleichzeitiger Einführung eines neuen Tropismus zu einem Tumorassoziierten Rezeptor oder Oberflächenmarker. Die rapide Zunahme von Wissen über die adenovirale Struktur und Biologie der letzten Jahre hat zu einigen signifikanten Errungenschaften geführt (142, 143). So wurden verschiedene Peptide als Liganden in unterschiedlichste Positionen des Fibers, Hexons oder Pentons eingefügt, und gezielte Punktmutationen in der Fiber-knob Region unternommen (143).

3.2 Klinische Studien mit adenoviralen Vektoren

Adenoviren sind aktuell das meist genutzte Vektorsystem in klinischen Studien der Krebsgentherapie. Zum Ende des Jahres 2005 waren mehr als 380 klinische Studien genehmigt und über 200 schleusten Patienten ein (144). Die meisten waren Phase-I und Phase-II Studien, womit die primären Ziele die Gewinnung von allgemeinen Daten zur Anwendungssicherheit (Phase-I) oder möglichen Effektivität (Phase-II) sind. Genetische Immunotherapie ist bislang der häufigste klinische Testansatz. Adenoviren könnten sich als ideale Vakzinen erweisen, da sie hochimmunogen sind und Effektivität mit Sicherheit verbinden (22, 145-148).

Zusätzlich zur genetischen Immunotherapie, lassen sich klinische Studien zur Krebstherapie mit adenoviralen Vektoren in drei weitere Hauptgruppen einteilen: a) Suizidgentherapie, b) Gensatz und c) Rezeptorbindung. Die Suizidgentherapie beinhaltet typischerweise die Inkorporation eines prodrug-konvertierenden Enzyms. Phase-I Studien wurden unter anderem durchgeführt zur Therapie von Gliomen (149-151), von Ovarialkarzinomen (152-154), von Prostatakarzinomen (155, 156) und Mesotheliomen (157). Interessanterweise war das overall survival von Gliom-Patienten, die nach Resektion in Ad-HSVtk/Ganciclovir, Retrovirus-HSVtk/Ganciclovir oder Kontrolle randomisiert wurden, in der Adenovirus Gruppe signifikant verlängert (149). Eine weitere randomisierte Studie mit 36 Gliompatienten resultierte ebenfalls in einem signifikant verlängertem Überleben der Patienten, die nach lokaler Injektion von Ad-HSKtk systemisch Ganciclovir erhielten (158). Eine Phase-III Studie ist zur Zeit offen.

Mehrere Studien kombinierten Suizidgentherapie und derzeit gebräuchliche Therapiemodelle. Zehn Patientinnen mit Ovarialkarzinomrezidiv unterzogen sich zunächst einer Debulkingoperation, erhielten nachfolgend zuerst eine intraperitoneale Therapie mit Ad-HSVtk, dann intravenös Ganciclovir und schließlich eine Chemotherapie mit Topotecan. Bei Publizierung der Studie lebten drei der zehn Patientinnen mit einer Nachbeobachtungszeit zwischen 30 und 31 Monaten (159). In einer weiteren Phase-I/II Studie wurde adenovirale Suizidgentherapie mit Bestrahlung und Hormontherapie kombiniert. Ziel war hier die Expansion des therapeutischen Index der Bestrahlung (160). Es wurde keine zusätzliche Toxizität durch die Kombination gefunden, und die Sicherheit dieses Ansatzes konnte so gezeigt werden. Auch zwei Jahre nach Abschluß der Therapie wurden keine

signifikanten Langzeit-Toxizitäten gefunden. In der Gruppe der low-risk Patienten wurden keine Metastasen oder positiven Biopsien nach 21 Monaten gefunden (161). In Bezug auf Gensatzstrategien erweist sich p53 als Hauptziel in Phase-I und Phase-II Studien (162-172). Die wohl vielversprechendsten Ergebnisse wurden nach intratumoraler Gabe der Adenoviren in Kombination mit Chemotherapie gesehen (173). Die chinesischen Gesundheitsbehörden ließen 2003 ein rekombinantes Ad-p53 (bekannt unter dem Markennamen Gendicine) für den klinischen Gebrauch zu (174, 175).

Als weiteres Tumorsuppressorgen wurde mda-7 in einer klinischen Phase-I Studie untersucht. Zehn Patienten mit soliden Tumoren erhielten intratumorale Injektionen gefolgt von Exzision der Läsionen, was die Demonstration der Transgen-Expression erlaubte (176). Rezeptorbindung wurde hauptsächlich an Patientinnen mit Ovarialkarzinom und erbB-2 als Ziel untersucht (177, 178). Keine der Studien zeigte dosislimitierende Nebenwirkungen, auch wenn bis zu $7,5 \times 10^{13}$ virale Partikel täglich an fünf aufeinander folgenden Tagen appliziert wurden (172). Daher kann geschlossen werden, daß Gentherapie mit nicht-replikationskompetenten Adenoviren als sicher anzusehen ist, und obwohl der Gentransfer durchaus variabel war, konnte in einigen Fällen Effektivität nachgewiesen werden.

4.1 Transcriptionales Targeting

Ein Promoter ist die Komponente der transkriptionalen Einheit, welche in die Bindung der RNA-Polimerase eingebunden und zur Initiierung der mRNA Transkription notwendig ist. Ein Promoter wird aktiviert von Transkriptionsfaktoren unter Gewebespezifischer Kontrolle. Damit muß ein Gewebe, in dem ein Promoter aktiviert werden soll, spezifische Faktoren exprimieren, die den Promoter erkennen. Eine Vielzahl von TSP wurde für die Krebsgentherapie untersucht, einigen fehlte jedoch ausreichende Aktivität, ausreichende Spezifität oder beides. Daher hat sich die Forschung in letzter Zeit auf die genaue Evaluation von Promotorkandidaten, welche die notwendigen Attribute aufweisen, fokussiert (Abb. 9).

4.1.1 Tumor-spezifische Promotoren

Als einer der ersten tumor-spezifischen Promotoren wurde der Promoter des carcinoembrionalen Antigens (CEA), welcher von vielen Magen-, Pankreas- und

Lungentumoren exprimiert wird, untersucht (179). Er wurde zur Steuerung eines HSVtk Elements eingesetzt, und während CEA-negative Zelllinien resistent gegenüber einer Ganciclovir Therapie waren, erwiesen sich CEA-positive Zellen ca. 1000-fach sensitiver (180). Nach intraperitonealer Injektion bei Mäusen mit CEA-exprimierenden Tumoren konnte eine signifikante Tumorregression gezeigt werden (180). Wichtiger noch war der signifikante Bystander-Effekt (27, 179). Ein Adenovirus, welches entweder lacZ oder CD unter der Kontrolle des CEA Promoter führte, zeigte signifikante Expression in Tumorxenographen und konnte die Überlebenszeit verlängern (181). Des weiteren fand sich nach intravenöser Applikation von Ad-CEA nur eine geringe Toxizität für normales Lebergewebe (182). Als Therapieoption für Hepatome wurde der Promoter des alpha-Fetoproteins (AFP) untersucht. Nach subkutaner Injektion in Hepatome in vivo zeigte sich signifikante Tumorregression (183).

Zur Therapie gynäkologischer Malignome wurden verschiedene Promotoren untersucht. Der L-Plastin Promoter (LP-P) wurde zur transkriptionellen Kontrolle einer lacZ Expression in Ovarial- und Mamma-Karzinom Zelllinien eingesetzt im Vergleich mit dem ubiquitären cmv-Promoter (184). In den Tumorzelllinien und Zellen aus Aszites erwiesen sich beide Promotoren als aktiv, wohingegen normale Hautfibroblasten und normale Peritonealzellen nur sehr geringe Aktivitäten für LP-P aufwiesen. Eine weitere Studie sah LP-P spezifische Expression von lacZ und CD in Zelllinien von Ovarial- und Blasenkarzinomen im Vergleich zu cmv (185). Mehr als drei viertel aller humanen epithelialen Ovariakarzinome exprimieren das DF3-Protein, wohingegen normale Mesothelzellen des Peritoneum dies nicht tun (186). Der DF3 Promoter erwies sich als spezifisch aktiv zur Expression von BAX in vitro für Ovariakarzinomzellen (187). Nach intraperitonealer Injektion in Ovarialtumortragende Mäuse war die BAX-Expression hauptsächlich im Tumorgewebe nachweisbar und über 99% Eradikation konnte gezeigt werden.

Der Cyclooxygenase-2 (cox-2) Promoter wurde zusammen mit dem midkine (mk) Promoter für Ovariakarzinome untersucht. Beide Promotoren waren in einer Palette von Ovariakarzinomzelllinien und primär-gewonnenen Tumorzellen aktiv, wohingegen die Aktivität in normalen Mesothelien und normalem Lebergewebe vermindert war (69).

Der cox-2 Promoter wurde ebenfalls im Kontext von Magenkarzinomen untersucht. Das Aktivitätsprofil des Promoters korrelierte zum cox-2 RNA Status in

Magenkarzinomlinien. Nach intravaskulärer Injektion erwies sich die Leberexpression mit cox-2 als geringer im Vergleich zum cmv Promoter. Cox-2 ist ausreichend aktiv um Zellyse in cox-2 positiven Zellen zu bewirken, wenn er HSVtk steuert, und dabei selektiv genug, um cox-2 negative Zellen auszusparen. In vivo zeigte sich eine deutlich verminderte Lebertoxizität im Vergleich zu cmv Promoter gesteuerten Viren (28).

Das Gen des sekretorischen Leukoprotease Inhibitors (SLPI) wird von verschiedenen Karzinomtypen exprimiert, unter anderem von Ovarialkarzinomzellen. Die Expression in Normalgewebe wie der Leber ist gering (188). Daher wurde der SLPI Promoter zur Transgen-Expressionssteuerung in Ovarialkarzinomzelllinien und primären Tumorzellen, gewonnen aus Aszitesproben, eingesetzt (189). Der Promoter war in vitro sowohl in den getesteten Zelllinien als auch primären Tumorzellen aktiv. Ein orthotopes Mausmodell mit disseminierten peritonealen Ovarialkarzinom wurde eingesetzt zum Nachweis hoher Tumor- versus geringer Leberexpression durch den SLPI Promoter. Adenovirales HSVtk unter der Kontrolle des SLPI Promoters verlängerte signifikant das Überleben in Kombination mit Ganciclovir (189). Als weitere Promotoren mit vielversprechenden präklinischen Ergebnissen wurden Tyrosinase, erbB2, Surfactant Protein B, Proopiomelanocortin und flt-1 getestet (190-193).

4.1.2 Tumorgefäß-spezifische Promotoren

Targeting von Gefäßendothelien in Tumorgewebe könnte ebenfalls einer Gentherapie zugänglich sein. Dieses Gewebe ist unabhängig vom Tumortyp und einfach per intravaskulärer Injektion zu erreichen. Zusätzlich sind Endothelzellen (EC) nicht maligne, damit keinem Selektionsdruck ausgesetzt und werden selten resistent gegenüber der Behandlung (194). E-Selectin Expression ist gering in normalen Blutgefäßen, jedoch hoch in Kapillaren von Tumorgewebe, weswegen der Promoter zur Steuerung adenoviraler Expression eingesetzt wurde. Nach Infektion exprimierten Endothelzellen das Reportergen auf hohem Niveau, wohingegen Nichtendothelzellen nur eine geringe Expression aufwiesen. Die Zugabe von TNF-alpha als Promoterinducer führte zu einer weiteren Steigerung der E-Selectin Aktivität (195). Der Maus-Preproendothelin-1 (PPE-1) Promoter wurde ebenfalls als TSP zur adenoviral-vermittelten Steuerung in Endothelzellen eingesetzt.

Systemische Gabe bei Lungentumor-tragenden Mäusen ergab eine selektive Genexpression in der Neovaskulatur der primären Tumoren (196).

4.1.3 Therapie-induzierte Promotoren

Ein weiterer Ansatz der Krebsgentherapie steuert die Genexpression mit Promotoren, die durch eine konventionelle Behandlung wie Chemotherapie oder Bestrahlung induziert werden. Ein Beispiel ist der early growth response gene 1 (EGR-1) Promotor. Nach Induktion durch Bestrahlung steuerte er als TSP die spezifische Expression von lacZ und HSVtk in Gliomen und hepatozellulären Karzinomen. Die Bestrahlungs-induzierte Transkription des EGR-1 Promotors wurde schon mit relativ geringen Dosen erreicht (197, 198).

Die Kombination von Bestrahlung und strahleninduzierter adenoviraler Gentherapie wird für Zervixkarzinom-Modelle entwickelt und zeigte erste vielversprechende Ergebnisse in präklinischen Studien (199).

TSP haben das Potential, die potentielle Toxizität einer Krebsgentherapie zu mindern und stellen eine bedeutende Möglichkeit dar zur spezifischen Steuerung der Genexpression in malignen Zellen. Sie können jedoch nicht die Effektivität der adenoviralen Infektion der Zielzellen erhöhen. Durch Kombination des transkriptionalen Targeting mit Methoden zur Infektivitätserhöhung können deutlich verbesserte Vektorsysteme konstruiert werden.

4.2 Transduktionales Targeting

Transduktionale Targeting Strategien (Abb. 6) dienen einer selektiven Erhöhung des Gentransfers in die Zielzellen bei gleichzeitig reduzierter Aufnahme des übrigen Gewebes. Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Ansätze des transduktionalen Targeting: a) genetisch und b) physikalisch. In einigen Publikationen werden sie auch als ein-Komponenten beziehungsweise zwei-Komponenten Targeting bezeichnet. Erstere beinhaltet die genetische Modifikation des Adenoviruses mit Inkorporation eines Liganden, welcher Zielzell-spezifische Rezeptoren erkennt, und/oder den natürlichen Rezeptor blockt.

4.2.1 Genetisches transduktionales Targeting

Mehrere Bereiche der Adenoviren sind geeignet zur Inkorporation von Liganden. Einer ist der HI-Loop des Fibers, in welchen ein Integrin-bindendes RGD-4C Motiv

integriert werden kann (11, 15). RGDTKSSTR ist ein RGD-4C modifizierter adenoviraler Vektor, der sowohl HSVtk zur molekularen Chemotherapie als auch das humane Somatostatin Rezeptor Subtyp-2 (SSTR2) Gen zum nicht-invasiven Imaging enthält (46). Das RGD-4C Motiv erlaubt die präferentielle Infektion von Ovarialkarzinomzelllinien und primären Ovarialkarzinomzellen. Die verstärkte Infektion war auch in Anwesenheit von Aszites nachweisbar. Des Weiteren wurde eine klinische Anwendung gespiegelt durch die intraperitoneale Gabe von RGDTKSSTR bei Mäusen mit disseminiertem humanen Ovarialtumoren unter Zusatz von malignem Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen. Signifikant verlängertes Überleben wurde gesehen im Vergleich mit einer isogenetischen RGD-4C freien und weiteren Kontrollen (200). Dieser Ansatz wurde klinisch getestet an Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom (201), Ergebnisse wurde bislang aber noch nicht veröffentlicht.

In einer weiteren Studie wurden Adenoviren mit Luziferase als Reportergen mit und ohne RGD-4C Modifikation getestet (25). In stringenten präklinischen Modellen mit primären Ovarialkarzinomzellen (in An- und Abwesenheit von neutralisierenden Antikörpern) sowie in einem murinem Ovarialkarzinom-Modell fand sich eine deutlich erhöhte Gentransferrate durch die RGD-4C modifizierten Viren.

Da Adenoviren bevorzugt in der Leber akkumulieren und dort potentiell lebertoxisch wirken, ist Untargeting der Leber ein wichtiges Ziel (136, 202). Hierzu wurden Viren erzeugt, welche weder an CAR noch an zelluläre Integrine binden. Gemeinsam stehen sie für ein Großteil der hepatischen Adenovirusaufnahme. Die so modifizierten Viren erwiesen sich als signifikant reduziert bezüglich ihrer Transduktionsfähigkeit von Lebergewebe (203). Eine zusätzliche Ablation der Heparansulfat-Glykosaminykan-Bindungsstelle des Fiberschafts, ein weiteres wichtiges Rezeptorelement der adenoviralen Infektion, führte zu einer Abrogation der Lebertransduktion *in vitro* und *in vivo*. Die Transduktion des Zielgewebes war bei diesen Viren zwar ebenfalls reduziert, jedoch zu einem deutlich geringeren Prozentsatz (204).

4.2.2 Fiber-Chimären

Nicht alle adenoviralen Serotypen binden an CAR und haben somit einen anderen Tropismus. Fiber-Chimären sind in Fiber oder Knob verändert durch Ersatz des

originären Elements durch das eines anderen adenoviralen Subtyps (73, 77-79). Adenovirus Typ 3 hat einen bislang nicht-identifizierten Rezeptor. Einige Publikationen sehen CD46 als Ad3-Rezeptor an (80), mehrere aktuelle Veröffentlichungen fanden jedoch CD46 eher als möglichen Rezeptor für alle übrigen Adenoviren der Subgruppe B mit Ausnahme des Adenovirus 3 (81, 82).

Nichts desto trotz, Chimären des Adenovirus Typ 5 mit der Fiberdomäne des Adenovirus Typ 3 haben einen bis zu 291-fach erhöhten Gentransfer in Ovarialkarzinomzelllinien und primäre Tumorzellen (26). Wichtig ist zudem, daß sowohl Biodistribution als auch Toxizität im Mausmodell für Ad5/3-Chimären und RGD-modifizierte Viren sich nicht signifikant von der des Adenovirus 5 Wildtyp unterscheiden, welcher sich in klinischen Studien bereits als sicher erwiesen hat.

Ebenso wurden Adenoviren mit Polylysin-Motiven im C-Terminus des Fibers kloniert. Diese Modifikation erlaubt eine CAR-unabhängige Bindung zu Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG). Heparansulfat-Proteoglykane stellen wie bereits erwähnt eine Subgruppe des adenoviralen Rezeptors dar, und sind bevorzugt auf Tumorzellen exprimiert. Konsequenterweise zeigten die so modifizierten Viren eine deutlich bevorzugte und erhöhte Infektiosität für Tumorzellen (205-207).

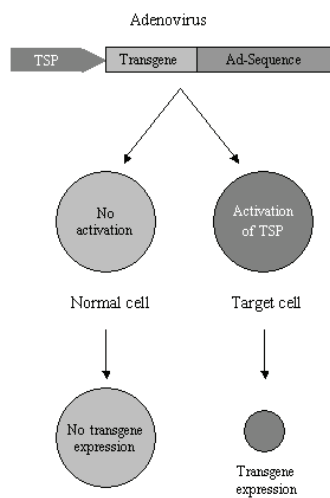
4.2.3 Physikalisches transduktionales Targeting

Bei physikalischen Targeting Methoden werden die Adenoviren mit bispezifischen Molekülen verbunden, welche sowohl CAR als auch einen weiteren Zelltyp-spezifischen Rezeptor erkennen. Der größte Vorteil dieser Methode besteht in der Fülle von Antikörpern und Liganden, die für diesen Ansatz ausgewählt werden können. Beispielsweise wurde der fibroblast growth factor Typ 2 (FGF2) mit dem Fab-Fragment eines anti-Knob Antikörpers konjugiert. Dieses Fab-FGF2 Konjugat wies eine bis zu 9-fach erhöhte Transgen-Expression in Ovarialkarzinomzellen auf. Nach intraperitonealer Applikation von HSVtk Viren bei tumortragenden Mäusen führte diese Modifizierung zu einer Überlebensverlängerung von 36 auf 44 Tage (208). Außerdem konnte eine verminderte hepatische Toxizität gezeigt werden (209). Der Ansatz verlängerte ebenso das Überleben bei Mäusen mit Melanom-Xenografts (209). Weitere Fab-Ligand-Konjugate wurden in ähnlicher Weise untersucht und brachten vielversprechende präklinische Ergebnisse (17, 18, 20, 21).

Ein anderer transduktionaler Targeting-Ansatz nutzt sCAR-Ligand Konjugate. Hier wird die sekretorische Ektodomäne von CAR mit dem gewünschten Liganden fusioniert. Der epidermal growth factor (EGF) wurde zum Beispiel mit sCAR konjugiert mit dem Ziel, Adenoviren gegen solche Zellen zu richten, welche den EGF-Rezeptor überexprimieren (23, 24). Eine dosisabhängige Steigerung der Luziferase Expression wurde in Zelllinien nachgewiesen sowohl für nicht-replizierende als auch für onkolytische Adenoviren (45). Wurden zuvor mit onkolytischen Adenoviren infizierte Zellen subkutan injiziert, reichten 1% von mit diesen gerichteten Adenoviren infizierten Zellen in der injizierten Suspension aus, um Tumorstadium zu verhindern, und 5% genügten, um etablierte Tumoren zu heilen. sCAR wurde ebenfalls an single-chain Antikörper für c-erbB-2 Onkoproteine gebunden. Auch hier konnte ein signifikanter Anstieg des Gentransfers gesehen werden (210).

Obwohl zwei-Komponenten Targeting vielversprechende Ergebnisse zur Richtung von Adenoviren zu neuen Rezeptoren erbracht hat, bestehen weiterhin deutliche Nachteile bei diesem Ansatz. Zwei-Komponenten Gentransfersysteme haben eine deutlich komplexere Pharmakodynamik und -kinetik, und ihre Stabilität in vivo im Menschen wurde bislang nie untersucht. Daher erscheinen ein-Komponenten Systeme als eher einsatzfähig für klinische Gentherapiestudien.

Transcriptional targeting



Transductional targeting

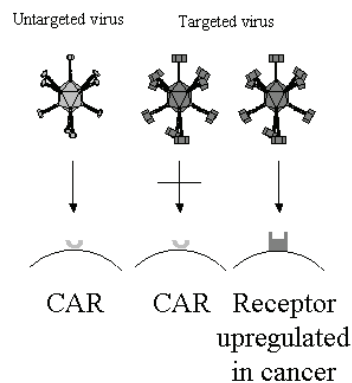


Abb. 6: A) Transkriptionales Targeting: Ein gewebespezifischer Promotor wird dem Transgen oder einem zur Replikation notwendigen Gen vorgeschaltet. Lediglich Zellen, die den gewebespezifischen Promotor exprimieren, können nun die Transkription des Transgens (nicht-replikative Viren) oder die Replikation (replikationskompetente Viren) aktivieren.

B) Transduktionales Targeting: Der Fiberknob des Adenovirus, verantwortlich für den Tropismus, wird ersetzt oder geblockt mittels eines anderen Bindungselements. Damit wird der Tropismus des Virus zu einem tumorspezifischen Rezeptor verändert.

5.1 Konditional replizierende Adenoviren (CRAds) als onkolytische Agenzien

Obwohl nicht-replizierende Adenoviren der ersten Generation *in vitro* und *in vivo* hohe Transduktionsraten und ein gutes Sicherheitsprofil gezeigt haben, lassen klinische Studien vermuten, daß der antitumorale Effekt mit diesem Ansatz alleine nicht ausreichend sein könnte (211). Tumortargeting und Infektionserhöhung haben zwar die präklinischen Ergebnisse dramatisch verbessert, für den klinischen Nutzen scheinen jedoch weiterhin mehrfache Gaben bei nicht-replizierenden Viren notwendig zu sein. Viren, die sich gezielt innerhalb des Tumorgewebe replizieren und ausbreiten, könnten durch eine verbesserte Tumorpenetration eine lokale Amplifikation des Effekts bewirken. Mit diesem Ziel wurden konditional replizierende Adenoviren (CRAds) entwickelt. CRAds sind genetisch modifizierte Viren, die

tumorspezifische Änderungen nutzen, um eine bevorzugte Replikation der Viren im Zielgewebe zu fördern (55, 76, 83, 212-214). Der virale Replikationszyklus endet mit der Zellyse, und führt damit zur Freisetzung der neugebildeten Virionen und nachfolgender Infektion der umgebenden Zellen (Abb. 7). Damit ist der antitumorale Effekt nicht durch ein Transgen vermittelt, sondern bedingt durch die eigentliche Replikation des Virus. Theoretisch hält dieser onkolytische Effekt an, bis keine Tumor- bzw. Zielzellen mehr vorhanden sind.

Es existieren zwei verschiedene Ansatzpunkte, um die virale Replikation zu kontrollieren. Einer ist die Kontrolle von Replikationsregulatoren, wie z.B. des frühen viralen Gens E1 durch einen TSP, was als Typ-I CRAd bezeichnet wird. Der andere beinhaltet die Nutzung spezifischer Deletionen im viralen Genom (Typ-II CRAd), die nur durch ebenso spezifische Faktoren der Zielzelle überwunden werden können (35, 40). Beide Faktoren können kombiniert werden mit dem Ziel einer weiter erhöhten Spezifität (72).

Ein Promotor ist eine DNA Sequenz, die eine Transkription des nachfolgenden Gens erlaubt. Er funktioniert gemeinsam mit anderen Regulatorregionen (z.B. Enhancern, Silencern, Insulatoren) und steuert so das Transkriptionslevel des kontrollierten Gens. Bei CRAds wird das Transkriptionslevel von Replikationsgenen kontrolliert, wodurch die Replikation der Viren auf solche Zellen begrenzt wird, in welchen dieses Promotorelement aktiv ist.

Eine Vielzahl von Promotoren wurde getestet zur Steuerung der viralen Replikation (29, 215-221). In den meisten Fällen kontrolliert der TSP die Expression von E1A als dem entscheidenden Regulator der adenoviralen Replikation. PSA und Kallikrein-2 wurden als TSP für Prostatakarzinome getestet und AFP für Hepatome (209, 217, 219). Bei Einsatz des DF3/MUC1 Promotors zur Steuerung von E1A in Mammakarzinomzellen zeigte sich dort eine ähnliche Replikationsstärke wie bei Wildtypadenoviren, wohingegen in negativen Zelllinien die Replikation deutlich vermindert war. Eine intratumorale Einzelinjektion dieses TSP-kontrollierten CRAds führte in vivo zu einer signifikanten Reduktion der Tumorlast (220). Zur Behandlung solider Tumoren in der Kinderheilkunde wurde midkine (MK) als TSP utlisiert. Dieses CRAd zeigte spezifische und hochaktive Replikation in MK-positiven Zellen und führte in vitro rasch zu einem kompletten Tumorzelltod (222). Um den onkolytischen Effekt weiter zu erhöhen, wurden Transgenelemente für Zytokine oder Prodrug-aktivierende Enzyme in das virale Genom eingefügt (220, 223, 224). Der

letztgenannte Therapieansatz könnte auch zur Minderung der Virusreplikation im Falle deutlicher Toxizität eingesetzt werden.

Des weiteren existieren mehrere Ansätze zu spezifischen Deletionen im viralen Genom zur Erzeugung von CRAbs. Die Replikation der Viren ist hier gesteuert durch Deletionen in viralen Replikationsgenen, welche in normalen Zellen die Replikation blockieren, von mutierten Zellen jedoch umgangen werden können und so dort zu Replikation mit abschließender Lyse führen.

Als erstes CRAb dieser Art wurde ONYX-015 vorgestellt. Es weist zwei Mutationen in Genen auf, die für das E1B 55-kd Protein kodieren (225, 226). Die Aufgabe dieses Proteins besteht in der Bindung und Inaktivierung von p53 in infizierten Zellen und Induktion der S-Phase, Grundvoraussetzungen für die virale Replikation (34-37). Daher sind diese Viren geeignet, präferentiell in p53-mutierten Zellen zu replizieren, ein häufiges Merkmal vieler Tumorzellen (34). Alternative Mechanismen der Replikationssteuerung dieser Viren wurden diskutiert (227), und ihre Selektivität in Frage gestellt (228, 229). Unabhängig von diesen Fragestellungen zeigten erste Studien, daß dieses Virus effektiver in Tumorzellen als in Normalzellen repliziert (35, 83, 230-232). Allerdings ist die Funktion von E1B 55-kd nicht alleine die p53-Bindung (232), weshalb dieses Virus im Vergleich zu Wildtypadenoviren deutlich ineffizienter repliziert (34, 231, 233). Zusätzlich haben einige Studien eine Replikation von ONYX-015 in normalem, nicht Zielgewebe gefunden (234, 235).

Die zweite Hauptgruppe der Gruppe-II-CRAbs ist gekennzeichnet durch eine 24 Basenpaar Deletion in der konstanten Region 2 (CR2) des E1A Gens (35, 40, 41). Dieser Bereich des E1A Proteins ist verantwortlich für die Bindung des Retinoblastoma Tumorsupressor/Zellzyklusregulator Proteins (Rb), notwendig für eine effektive Virusreplikation (142). Viren diesen Deletions-Typs haben eine verminderte Fähigkeit, den G1-S-Phase Checkpoint zu passieren. Daher können sie sich nur in solchen Zellen effektiv replizieren, in denen dieser Schritt nicht notwendig ist; hauptsächlich Tumorzellen sind defizient im Rb-p16 pathway (40, 55), und die Studienlage indiziert, daß dies für fast alle humanen Tumorarten der Fall ist (236). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, daß die Replikation von CR2-deletierten Viren minimiert ist in nicht-replizierendem Normalgewebe (40, 55). Interessanterweise konnte die Replikation ebenfalls signifikant reduziert werden, wenn Rb in zuvor defekten Zellen reaktiviert wurde (40).

Adenoviren mit Mutationen in sowohl CR1 als auch CR2 Regionen von E1A (delta2-delta24-Viren) erlauben ihre Replikation nur in solchen Zellen, welche Onkoproteine E6 und E7 des humanen Papillomvirus exprimieren (76). Auch wurden CRAds mit einer zusätzlichen Deletion in CR3, der Bindungsstelle für den p300 Zellzyklusregulator, beschrieben (42). Diese Viren wurden weiter modifiziert durch Ersatz des natürlichen Promotors von E4 durch einen TSP (237).

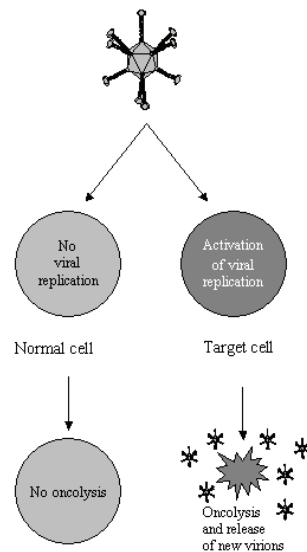


Abb. 7: Konditional replikative Adenoviren sind in ihrer Replikation gebunden an spezifische Faktoren ihrer Ziel- (Karzinom-)zellen. Replikation der Viren führt zu onkolytischem Zelltod und Freisetzung neuer Virionen zur Infektion umliegender Zellen.

5.2 Gerichtete konditional replizierende Adenoviren

Nicht gerichtete CRAds infizieren die Zielzellen basiert auf ihrem Expressionslevel von CAR, welcher extrem unterschiedlich bei klinischen Tumoren ist. Trotzdem zeigten schon diese Erstgenerations-CRAds einen gewissen klinischen Nutzen (136). Dieser Anfangserfolg läßt vermuten, daß bei effektiverer Infektion und spezifischer Replikation der Viren weitere Verbesserungen möglich sind und ein klinischer Nutzen erreicht werden könnte. Diese Vermutung wird unterstützt durch den Nachweis einer engen Korrelation zwischen Infektivität und onkolytischer Potenz (14, 45, 238). Konsequenterweise wurden CRAds mit verbesserter

Infektionskapazität konstruiert und zeigten beeindruckende präklinische Ergebnisse. Ad5- Δ 24RGD ist ein CR2 mutiertes CRAAd mit einem RGD-4C Motiv im Fiber (41, 239), welches ähnliche onkolytische Potenz wie ein Wildtyp Adenovirus in Ovarialkarzinomzellen zeigt. Des Weiteren ist dieses CRAAd in der Lage, effizient in Sphäroiden von primären Ovarialkarzinomzellen zu replizieren, und führte zu einem signifikant verlängertem Überleben in einem aggressiven orthotopen Ovarialkarzinommodell (16). Diese Ergebnisse führten zu einer Phase I Studie, in der Patienten mit Gliom oder Ovarialkarzinom mit Ad5- Δ 24RGD behandelt wurden (240). Als weiterer Ansatz zur Verbesserung der Infektion von Tumorzellen durch CRAAds wurden Fiber-Chimären kloniert. Diese Chimären haben beispielsweise Bindungselemente bestehend aus Tail und Shaft von Adenovirus Typ 5 und Knob des Adenovirus Typ 3 (25, 26, 73, 241), und Ad5/3 Δ 24 erwies sich als hoch onkolytisch mit einer klar bevorzugten Replikation in Tumorgewebe. Auch hier wurde ein Protokoll für eine klinische Anwendung zugelassen und die Öffnung einer Studie wird in Kürze erwartet. Außer Ad5/3 Chimären wurden auch solche aus Ad5 und Ad11 (242, 243) sowie Ad5 und Ad35 (244, 245) untersucht (246).

Die aktuelle Entwicklung geht zu doppelt oder sogar dreifach modifizierten CRAAds um die Spezifität der Infektion weiter zu erhöhen und gleichzeitig die onkolytische Potenz der Viren zu erhalten (29, 71, 72). So führte beispielsweise die Kombination des tumorspezifischen Promotors *cox2L* mit einer CR2 mutierten E1A Transkomplementation und der Ad5/3 Fiber-Chimäre zu dem CRAAd Ad5/3*cox2L* Δ 24, welches hoch-selektive Replikation in Tumorgewebe aufwies bei vollständig erhaltenener onkolytischer Potenz (29).

Ein bislang ungelöstes Problem in der präklinischen Testung von CRAAds bezüglich Effektivität und Anwendungssicherheit ist das Fehlen eines adäquaten Tiermodells. Humane Adenovirus Serotypen replizieren sich nicht bis kaum im Gewebe der weithin genutzten Maus- oder anderer Tiermodelle. Daher sind aussagefähige Daten zur Anwendungssicherheit nur schwerlich zu erhalten, und Aussagen zur Effektivität könnten verfälscht sein durch die fehlende Immunantwort in vielen Xenograph-Modellen. Daher wurden eine Vielzahl weiterer Tiermodelle untersucht, und cotton rats (247), Syrian hamsters (63) und Schweine (64) wiesen zumindest in gewissen Geweben eine reduzierte Replikation humaner Adenoviren auf.

5.3 Klinische Studien mit CRAds

Die erste klinische Studie mit replikationskompetenten Adenoviren wurde bereits kurz nach ihrer Entdeckung in den 1950er Jahren durchgeführt. Unterschiedliche Serotypen von Wildtyp Adenoviren wurden intratumoral, kombiniert intravenös-intraarteriell oder rein intravenös bei Patientinnen mit Zervixkarzinom appliziert. Neben der klinischen Response wurde auch der Effekt einer Immunsuppression untersucht. Die overall response Rate, gemessen als Formation von Nekrosearealen, war 65% (248). Die Autoren der Studie beschrieben keinerlei schwerwiegenden Nebenwirkungen, jedoch war ein Wiederauftreten des Tumors häufig. Die erste klinische Studie mit einem CRAd startete fast 50 Jahre später und basierte auf der Entwicklung von viralen Vektoren, welche sich bevorzugt und besser im Zielgewebe replizieren (Tabelle 7).

Das erste in einer klinischen Studie eingesetzte CRAd war das ONYX-015 Virus. In einer begrenzten Anzahl von Biopsien aus injiziertem Tumorgewebe konnte die Replikation von ONYX-015 nachgewiesen werden. Es kam zu keinen schwerwiegenden Nebenwirkungen, das Sicherheitsprofil war exzellent (249, 250). Da Onkolyse theoretisch ein synergistischer Effekt zu Bestrahlung oder Chemotherapie mit nicht überlappenden Nebenwirkungen und Toxizitätsprofil ist (35, 37), erschien es offensichtlich, CRAd Therapie mit diesen beiden Ansätzen zu kombinieren. Hierfür zeigen eine Reihe klinischer Studien vielversprechende Ergebnisse bei sehr gutem Sicherheitsprofil (38, 39, 250).

Besonders vielversprechende Daten erbrachte eine Phase II Studie mit kombinierter Anwendung von intratumoral injizierten ONYX-015 und gleichzeitiger Cisplatin/5-Fluorourazil Chemotherapie bei 30 Patienten mit fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren (38). 83% der Tumoren sprachen auf die Therapie an; bei 63% war die Reaktion offensichtlich mit über 50% Reduktion der Tumormasse. Partielle Response wurde bei 36% nachgewiesen, und 27% der Patienten hatten eine „komplette“ Response. Dies ist besonders interessant, da Kopf-Hals-Tumoren als häufig resistent zu gegenwärtigen Behandlungsoptionen gelten. Obwohl die Patienten dieser Studie oft mehrere Tumoren aufwiesen, wurde je nur einer für die virale Injektion ausgewählt. In der weiteren Nachbeobachtungszeit kam es häufiger bei den nicht injizierten Tumoren zu einem erneuten Wachstum bzw. Wiederauftreten. Eine weitere Studie mit ähnlichem Ansatz erbrachte vergleichbare Datensätze (39). Die

Öffnung einer Phase III Studie mit ONYX-015 ist für die USA seit 2002 geplant (39), wurde jedoch bislang nicht gestartet. Statt dessen wurde in China mit einem eng verwandten Virus, H101, eine Phase III Studie durchgeführt (251). Die zusätzliche Therapie mit Virus in Kombination mit Chemotherapie erhöhte die Responderate von 39,6 auf 78,8%. Eine Zunahme an schwerwiegenden Toxizitätsereignissen wurde hierbei nicht beschrieben. Bislang ist dies die einzige randomisierte klinische Studie mit CRAds, welche publiziert wurde. Im November 2005 wurde H101 von den chinesischen Behörden in Kombination mit 5-FU klinisch zugelassen (252).

Ein anderes in klinischen Studien eingesetztes CRAd ist CV-706, ein Virus bei dem die Replikation unter der Kontrolle des tumorspezifischen PSA Promotors steht (253). In einer Phase I Studie mit 20 Patienten zeigte sich ein gutes Sicherheitsprofil. Auch konnte ein vorläufiger Nachweis von viraler Replikation und antitumoralen Effekts des Virus erbracht werden.

6. Modellsysteme – primäre Tumorzellen und Spheroide

Die präklinische Entwicklung neuer Therapieansätze mit replikationskompetenten Adenoviren ist limitiert durch geeignete Testsubstrate. Als Resultat ihrer Anpassung an die Wachstumsbedingungen in vitro haben Zelllinien hochwahrscheinlich Veränderungen in ihren Geno- und Phänotypen durchgemacht. Dies zeigt sich in den oft gefundenen Unterschieden zwischen Daten, gewonnen von Zelllinien, und solchen von klinischen Proben. Der translationale Forschungsansatz von der Laborbank zum Patientenbett würde von Modellen, welche näher an der klinischen Realität sind, deutlich profitieren. Daher ist die Isolation von reinen Krebszellen ohne Beisatz von Normalgewebe aus klinischen Proben ein attraktives Konzept. Eine dieser Methoden ist in der Isolation von primären Ovarialkarzinomzellen aus malignem Aszites bei diagnostiziertem Adenokarzinom des Ovars beschrieben. Es konnte eine Tumorzellpopulation mit 96%-iger Reinheit gewonnen werden (43). Von Nachteil ist, daß primäre Tumorzellen ex vivo nur sehr eingeschränkt Tests für Virusreplikation und Onkolyse zugänglich sind, da sie in Kultur nur eine sehr begrenzte Lebensfähigkeit von ca. 7 Tagen haben (254). Dies ist deutlich zu kurz für typische Assays mit CRAds. Auch sind die Zellkultur typischen Monolayer nicht geeignet, um die Virusdissemination in Tumoren zu testen, da humane solide Tumoren in der Regel dreidimensional sind. Dem entsprechend wurde ein dreidimensionales Modellsystem aus Spheroide von unpassagierten, aufgereinigten primären

Ovarialkarzinomzellen entwickelt, welches die meisten der zuvor genannten Probleme und Einschränkungen überbrückt (44, 73, 255, 256). Spheroide blieben in Kultur für über 4 Wochen vital und erlaubten so die Quantifizierung der CRA-Ad Replikation ex vivo in primärem Tumorgewebe.

7. Zukunftsperspektiven

Mit dem zunehmenden Verständnis der molekularen Veränderungen in Krebszellen bietet sich die Gentherapie als logische Therapieoption an. Nach anfänglicher Euphorie und darauf notgedrungen folgender Enttäuschung, resultiert jetzt die stringente Forschung im präklinischen und Basisbereich in ersten klinisch anwendbaren Ansätzen. In Bezug auf die Immunogenität von Adenoviren, welche nützlich ist als Auslöser einer Immunreaktion gegen infizierte Tumorzellen aber gleichzeitig tödlich sein kann, wenn eine zu hohe Virusdosis gegeben wird (257), ist es wichtig darauf hinzuweisen, daß die Anwendungssicherheit der Adenoviren nie ein limitierender Faktor in klinischen Studien war. Im Gegenteil, schwerwiegende Nebenwirkungen oder Toxizität traten in den klinischen Studien zur Krebstherapie nie auf (1, 240). Ebenso gibt es Hinweise auf eine echte antitumorale Wirksamkeit der adenoviralen Gentherapie (38, 149, 158, 173, 175, 251).

Auch konnte in anderen Medizinbereichen nachgewiesen werden, daß Gentherapie krankheitsbedingende Phänotypen korrigieren kann (258-261). Beiden Ansätzen gemeinsam ist der rationale Ansatz, den die Forscher wählten zur Entwicklung ihrer Gentransfer-Vektoren. Die Durchbrüche im klinischen Bereich fußen also auf den Fortschritten in der Vektorentwicklung. Es bleibt abzuwarten, ob weitergehende Verbesserungen der Krebsgentherapie-Reagenzien schlußendlich zu einem ähnlichen klinischen Erfolg führen. Die erfolgreiche und möglichst vollständige Transduktion des Tumorgewebes ist der limitierende Faktor, welcher mit zunehmend besseren Vektoren angegangen wird. Hauptstützen werden hier wohl replikationskompetente Systeme, Erhöhung und Steuerung der Vektorinfektiosität sein. Diese zuvor beschriebenen onkolytischen Adenoviren haben die Möglichkeit einer Amplifikation im Tumorgewebe. Durch immer genauere Steuerung der Replikationskompetenz (transkriptionales Targeting) und immer gezieltere Infektiosität für Tumorzellen (transduktionales Targeting) konnten in vitro und zum Teil auch in vivo um mehrere Zehnerpotenzen bessere Daten als mit den onkolytischen Viren der

ersten Generation erreicht werden, die bislang in klinischen Studien eingesetzt wurden (16, 29, 86). Klinische Studien mit onkolytischen Viren der zweiten oder dritten Generation stehen jedoch bislang aus.

Ein weiteres zu lösendes Problem ist die begrenzte Möglichkeit der Einflußnahme auf einmal applizierte Vektorsysteme. Die Behandlung der Nebenwirkungen einer viralen Therapie war bislang rein symptomatisch. Mit Chlorpromazin und Apigenin scheinen sich hier zwei Wirkstoffe zu etablieren, mit denen virale Replikation in vitro und in vivo reduziert werden kann. Dies entspräche einer kausalen Therapie möglicher Toxizitäten einer viralen Gentherapie (Kanerva, in press).

8. Schlußfolgerungen

Derzeitige Therapieoptionen vieler Karzinomarten sind häufig limitiert, und insbesondere die Therapie fortgeschrittener Stadien ist oft rein palliativ. In den vergangenen Jahrzehnten konnte insbesondere die Therapie früher Karzinomstadien deutlich verbessert werden mit Hilfe moderner Chemotherapien, gezielterer Bestrahlung und verbesserter Operationstechniken. Der klinische Benefit für Patienten mit fortgeschrittenen Stadien ihrer Erkrankung war deutlich weniger dramatisch. Auch bleibt die Toxizität der aktuellen Therapieverfahren ein relevantes Problem. Es besteht also weiterhin ein Bedarf für neue und weiter verbesserte Therapieverfahren, welche diese Probleme lösen könnten. Obwohl die Gentherapie sich als potentieller Kandidat hervorgetan hat, und erste klinische Nachweise für Effektivität und Sicherheit dieser Therapieoption existieren, blieben klinische Erfolge mit Viren der ersten Generation bislang aus. Es bleibt abzuwarten, ob sich die dramatischen Verbesserungen, welche mit Viren der nachfolgenden Generationen erreicht wurden, auch in klinischen Studien zeigen. Dank der additiven oder synergistischen Effekte, welche Gentherapie mit etablierten Therapien wie Bestrahlung oder Chemotherapie zeigt, ist es wahrscheinlich, daß die Gentherapie in einer solchen Kombination zu einer klinischen Anwendung kommen wird. Hierbei ist ein wichtiger Aspekt, daß die Nebenwirkungen der adenoviralen Gentherapie wenig bis keine Überlappung zu denen der Bestrahlung oder Chemotherapie aufweist. In China wurde onkolytische Gentherapie nach dort durchgeführten Phase-III Studien mit einem ONYX-015 ähnlichen Virus in Kombination mit Chemotherapie Ende 2005 klinisch zugelassen (252).

Tabelle 7: Klinische Studien mit konditional replikativen Adenoviren zur Krebstherapie^a

Ansatz	Phase	Patienten	Max. Dosis ^f	Route ^c	Erkrankung ^d	Ref.
Wildtyp-Ad (verschiedene Serotypen)	ne ^b	30	nd ^h	it, ia, iv	Zervix Ca.	(248)
ONYX-015	I	22	1x10 ¹¹ PFU	it	SCCHN	(249)
ONYX-015	I	23	1x10 ¹¹ PFU	it	Pankreas Ca.	(262)
ONYX-015	I	10	2x10 ¹³ VP	iv	Metastaten in der Lunge	(263)
ONYX-015	I	16	1x10 ¹³ VP/d x5d	ip	Ovarial Ca.	(264)
ONYX-015	I	16	1x10 ¹¹ PFU/d x5d	ip	Ovarial Ca.	(265)
dl1520-TK-CD ^{e,g}	I	9	1x10 ¹² VP	it	Prostata Ca.	(266)
CV706	I	20	1x10 ¹³ VP	it	Prostata Ca.	(65, 253)
ONYX-015	I-II	33	2x10 ¹² VP	iha	Colorektale (und andere GI) Ca. metastasiert in die Leber	(267)
dl1520 ^e + 5-FU (in Phase II)	I-II	16	3x10 ¹¹ PFU	it, iv, iha	hepatozell. Ca. und GI Ca. metastasiert in die Leber	(268)
ONYX-015	II	40	1x10 ¹¹ VP/d x 10d/2wk cycle	it	SCCHN	(250, 269)
ONYX-015 + Cisplatin + 5-FU	II	37	1x10 ¹⁰ PFU/d x 5d	it	SCCHN	(38)
ONYX-015 + Cisplatin + 5-FU	II	14	1x10 ¹⁰ PFU/d x 5d	it	SCCHN	(39)

ONYX-015 +/- Gemcitabine	I-II	21	2x10 ¹¹ VP, 1/wk, 8 cycles	it	Pankreas Ca.	(270)
ONYX-015	II	18	2x10 ¹² VP every two weeks	iv	Metastasierte colorektale Ca.	(271)
CG7870	I-II	20	1x10 ¹³ VP	it	Lokal rekurrente Prostata Ca.	(272)
H101 + Cisplatin or Adriamycin + 5-FU	III	160	1.5x10 ¹² VP/d x 5d	it	SCCHN	(251)
CG7870	I	23	6x10 ¹² VP	iv	Metastasierte Prostata Ca.	(273)
Gesamtzahl		528				

^a Versuch der Darstellung möglichst aller klinischen Studien mit onkolytischen Adenoviren. Für eine komplette Auflistung der Gentherapiestudien, siehe (274, 275)

^b **ne** = nicht erfaßt

^c **iv** = intravenös, **ia**. intra-arteriell, **it** = intratumoral, **ip** = intraperitoneal, **iha** = intrahepatische Arterie

^d **Ca.** = Karzinom, **SCCHN** = squamous cell cancer of the head and neck, **GI** = gastrointestinal

^e dl1520 ist der Originalname von ONYX-015, ebenfalls veröffentlicht als CI-1042.

^f bezieht sich auf die maximale Dosis per Zyklus falls mehrere Zyklus appliziert wurden. Oft wurde die maximal tolerierte Dosis nicht erreicht. **VP** = viral particles. **PFU** = particle forming (infectious) units.

^g **TK** = Herpes simplex Virus Thymidinkinase, **CD** = Cytosindeaminase

^h nicht bestimmt durch Methoden vergleichbar zu heutigen Assays

Zusammenfassung

Diese Arbeit spannt den Bogen adenoviraler Therapie von ihren ersten Anfängen mit nicht-replizierenden adenoviralen Vektoren zu den aktuellen mehrfach modifizierten konditional replizierenden Adenoviren.

Jeder Promoter, der nach Klonierung in das adenovirale Genom aktiv bleibt, ausreichende Transgenexpression bewirkt und einen „liver-off“ Phänotyp aufweist, ist als potentiell klinisch nützlich anzusehen. Wir fanden den *flt-1* Promotor aktiv in Teratokarzinomzellen, unabhängig davon, ob die Zellen von Ovar- oder Testisgewebe abstammten. Der zusätzliche Nachweis einer engen Korrelation von Transgenexpression und *flt-1* mRNA in unserer Studie ist ein weiterer Hinweis, daß dieser Promotor die gewünschte Charakteristik aufweist. Demnach könnte der *flt-1* Promotor ein guter Kandidat für transkriptionelles Targeting von Teratokarzinomen sein.

Im nächsten Schritt testeten wir ein replikationskompetentes Virus, Ad5- Δ 24RGD, zur Behandlung von Ovarialkarzinommodellen. Wir sahen eine dem Wildtypvirus vergleichbare Replikation und Onkolyse in Ovarialkarzinomzelllinien sowie in dreidimensionalen Sphroiden primärer Tumorzellen. Wir maßen eine exponentielle Zunahme von Ad5- Δ 24RGD Partikeln in primären Zellen als Hinweis auf hocheffiziente Replikation des Virus. Abschließend fanden wir in einem orthotopen Mausmodell für peritoneal-metastasierte Ovarialkarzinome einen signifikanten Überlebensvorteil für mit Ad5- Δ 24RGD behandelte Mäuse und in 50% eine vollständige Eradikation des Tumors. Daher ist Ad5- Δ 24RGD als effektive experimentelle Therapieoption für Ovarialkarzinome anzusehen, und könnte potentiell auch bei anderen Tumorentitäten aktiv sein.

Dies konnten wir insbesondere für die Behandlung von Zervixkarzinomen demonstrieren. Ad5- Δ 24RGD wurde nach in vitro Nachweis der Effektivität sowohl lokal als auch systemisch appliziert, und ein therapeutischer Nutzen konnte auch für geringe Virusdosen gezeigt werden, die (konvertiert in humane Dosen) in anderen Zusammenhängen bereits klinisch appliziert worden waren und ein gutes Sicherheitsprofil aufwiesen. Damit konnten wir den Nachweis erbringen, daß Ad5- Δ 24RGD ein sinnvoller Kandidat für klinische Studien an Ovarial- und

Zervixkarzinomen bei Patientinnen ist, die sich als refraktär für derzeitige Therapieoptionen erwiesen haben.

Davon unbesehen stellt die Möglichkeit schwerer Nebenwirkungen in den angestrebten klinischen Studien durch eine Replikation der Viren außerhalb des Tumors Grund genug dar, diesbezüglich schon im vorhinein Anstrengungen zu unternehmen. Wir testeten zwei Varianten des cox2 Promotors in Kombination mit drei verschiedenen E1-Transkomplementationen und fanden deutlich erhöhte Spezifität und Effektivität bei Viren, die eine Kombination aus cox2 Promotor und delta24 Deletion aufwiesen, im Vergleich zu Viren ohne diese Deletion. Desweiteren waren delta24-CRAds denen mit delta2delta24 Mutation überlegen, da sie eine stärkere Replikation bei vergleichbarer Spezifität zeigten. Auch war Ad5/3cox2Ldelta24 onkolytischer als Ad5/3cox2LE1 oder Ad5/3d24. Bei Zusammenschau der gewonnenen Daten an Ovarialkarzinomzellen (Ad5/3cox2Ldelta24 zeigte sich 100-fach effektiver) mit den Daten von primären Leberzellen (Ad5wt war 100- bis 1000-fach toxischer) ergab sich für Ad5/3cox2Ldelta24 ein therapeutisches Fenster von 10.000 bis 100.000 im Vergleich zu Ad5wt. Bezogen auf die Promotorkonfiguration erwies sich cox2L sowohl als spezifischer wie auch als effektiver im Vergleich mit cox2M. Daher erscheint Ad5/3cox2Ldelta24 als Virion der Wahl für weitere Untersuchungen und könnte neben Ad5/3d24 in klinische Studien Eingang finden.

Zusammengefaßt ist die spezifische und gleichzeitig effektive Transduktion von Tumorzellen der limitierende Schritt für adenovirale Vektoren. Erst dadurch werden replikationskompetente Viren wieder von größerem Interesse für klinische Studien. Ein zentrales Problem ist, daß der primäre Adenovirus-Rezeptor CAR von Tumorzellen oft nur minimal, von Normalgewebe und hier vor allem der Leber jedoch stark exprimiert wird. Targetingstrategien und Methoden zur gezielten Erhöhung der Infektiosität wurden daher angewandt und erbrachten signifikante Erfolge auch in klinischen Studien. Und obwohl andere virale Vektoren als besser zur Therapie hereditärer Erkrankungen geeignet erscheinen, sind Adenoviren vielversprechende und sichere Substanzen in der Onkologie, was eine Vielzahl klinischer Studien gezeigt hat. Wichtiger noch konnten Synergien und ein Fehlen von Kreuzresistenzen in Kombination mit Chemotherapie oder Radiatio nachgewiesen werden. Daher könnte nicht nur in China eine Kombinationstherapie die Zukunft der CRAds in der Onkologie sein.

Danksagung

Viele Menschen haben mich in meinem wissenschaftlichen Werdegang unterstützt und gefördert. Namentlich erwähnen möchte ich:

Herrn Professor Hans Georg Bender, Direktor der Universitäts-Frauenklinik Düsseldorf, danke besonders ich für das Sehen meiner möglichen Fähigkeiten sowie seine langjährige klinische und wissenschaftliche Unterstützung und Ausbildung. Herrn Professor Peter Dall danke ich für seine Mentorentätigkeit und Freundschaft.

Herrn Professor David Tyler Curiel möchte ich für die außergewöhnliche Möglichkeit danken, an seinen weltweit führenden Institut die Grundlagen der Genterapie erlernen zu dürfen. Herausstellen möchte ich die von seiner Frau und ihm geschaffene familiäre Atmosphäre, die die Zeit in Alabama einzigartig gemacht hat.

Herrn Professor Jorma Paavonen und Herrn Professor Akseli Hemminki bin ich zu besonderem Dank verpflichtet, da sie mir ein wissenschaftlich sehr fruchtbares Jahr an der Universität Helsinki und dort die Promotion zum PhD ermöglicht haben. Des weiteren danke ich Professor Hemminki, mir wissenschaftliches Denken und Schreiben so geduldig und umfangreich vermittelt zu haben.

Ich danke allen wissenschaftlichen Wegbegleitern in Deutschland, Alabama und Helsinki; namentlich erwähnen möchte ich hier in Deutschland Artur, Daniel, Dieter, Isabell, Martina und Peter, in Alabama Angel, Anna, Akseli, Dirk, Kaori, John, Marianne, Shannon und Taco, sowie in Helsinki Anna, Akseli, Iulia, Minna, Sari, Sergio und Tanja. Sie alle sind mir in den Jahren zu guten Freunden geworden.

Dank gilt meinen Kollegen der Universitäts-Frauenklinik, die wissenschaftliches Arbeiten neben der Klinik ermöglichten, und mir zweimal eine Auszeit für wissenschaftliche Tätigkeit im Ausland gaben.

Meinen Freunden in Deutschland, hier namentlich Florian, Gisela, Kerstin, Klaus, Ralf und Stephan, danke ich für den Rückhalt und das Verständnis, wenn ich mal wieder keine Zeit hatte oder Zuspruch bedarf.

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders für die immerwährende finanzielle und ideelle Unterstützung meiner Ausbildung und Pläne danken. Ebenso meinem jüngeren Bruder Klaus für seine ständige Bereitschaft zur Übernahme von Alltagspflichten.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Sigrid Juselius Foundation und der Finish Cancer Society für ihre finanzielle Unterstützung.

Düsseldorf, Herbst 2007

Gerd Johannes Bauerschmitz

Literatur

1. Vattedi, E. and Claudio, P. P. Adenoviral gene therapy in head and neck cancer. *Drug News Perspect*, 19: 329-337, 2006.
2. Bauerschmitz, G. J., Barker, S. D., and Hemminki, A. Adenoviral gene therapy for cancer: From vectors to targeted and replication competent agents (Review). *Int J Oncol*, 21: 1161-1174, 2002.
3. Li, Y., Pong, R. C., Bergelson, J. M., Hall, M. C., Sagalowsky, A. I., Tseng, C. P., Wang, Z., and Hsieh, J. T. Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res*, 59: 325-330, 1999.
4. Miller, C. R., Buchsbaum, D. J., Reynolds, P. N., Douglas, J. T., Gillespie, G. Y., Mayo, M. S., Raben, D., and Curiel, D. T. Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Res*, 58: 5738-5748, 1998.
5. Fechner, H., Wang, X., Wang, H., Jansen, A., Pauschinger, M., Scherubl, H., Bergelson, J. M., Schultheiss, H. P., and Poller, W. Trans-complementation of vector replication versus Cocksackie-adenovirus-receptor overexpression to improve transgene expression in poorly permissive cancer cells. *Gene Ther*, 7: 1954-1968, 2000.
6. Cripe, T. P., Dunphy, E. J., Holub, A. D., Saini, A., Vasi, N. H., Mahller, Y. Y., Collins, M. H., Snyder, J. D., Krasnykh, V., Curiel, D. T., Wickham, T. J., DeGregori, J., Bergelson, J. M., and Currier, M. A. Fiber knob modifications overcome low, heterogeneous expression of the coxsackievirus-adenovirus receptor that limits adenovirus gene transfer and oncolysis for human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res*, 61: 2953-2960, 2001.
7. Okegawa, T., Li, Y., Pong, R. C., Bergelson, J. M., Zhou, J., and Hsieh, J. T. The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on human prostate cancer gene therapy. *Cancer Res*, 60: 5031-5036, 2000.
8. Okegawa, T., Pong, R. C., Li, Y., Bergelson, J. M., Sagalowsky, A. I., and Hsieh, J. T. The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and

- adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res*, 61: 6592-6600, 2001.
9. Seidman, M. A., Hogan, S. M., Wendland, R. L., Worgall, S., Crystal, R. G., and Leopold, P. L. Variation in adenovirus receptor expression and adenovirus vector-mediated transgene expression at defined stages of the cell cycle. *Mol Ther*, 4: 13-21, 2001.
 10. Kasono, K., Blackwell, J. L., Douglas, J. T., Dmitriev, I., Strong, T. V., Reynolds, P., Kropf, D. A., Carroll, W. R., Peters, G. E., Bucy, R. P., Curiel, D. T., and Krasnykh, V. Selective gene delivery to head and neck cancer cells via an integrin targeted adenoviral vector. *Clin Cancer Res*, 5: 2571-2579, 1999.
 11. Dmitriev, I., Krasnykh, V., Miller, C. R., Wang, M., Kashentseva, E., Mikheeva, G., Belousova, N., and Curiel, D. T. An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol*, 72: 9706-9713, 1998.
 12. Heinicke, T., Hemmi, S., Mauer, D., Sauerbruch, T., and Caselman, W. H. Transduction efficiency of adenoviral vectors in colorectal cancer cells is determined by the presence of the coxsackie adenovirus receptor. *Mol Ther*, 1: S126, 2000.
 13. Anders, M., Ding, R. X., Lipner, E. M., Balmain, A., McCormick, F., and Korn, W. M. Inhibition of the MAPK pathway Up-Regulates the Human Coxsackie and Adenovirus Receptor (CAR) and Increases the Infectivity of Cancer Cells with Adenovirus. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 42: 703, 2001.
 14. Douglas, J. T., Kim, M., Sumerel, L. A., Carey, D. E., and Curiel, D. T. Efficient oncolysis by a replicating adenovirus (ad) in vivo is critically dependent on tumor expression of primary ad receptors. *Cancer Res*, 61: 813-817, 2001.
 15. Krasnykh, V., Dmitriev, I., Mikheeva, G., Miller, C. R., Belousova, N., and Curiel, D. T. Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *Journal of Virology*, 72: 1844-1852, 1998.
 16. Bauerschmitz, G. J., Lam, J. T., Kanerva, A., Suzuki, K., Nettelbeck, D. M., Dmitriev, I., Krasnykh, V., Mikheeva, G. V., Barnes, M. N., Alvarez, R. D., Dall, P., Alemany, R., Curiel, D. T., and Hemminki, A. Treatment of ovarian cancer

- with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer Res*, 62: 1266-1270, 2002.
17. Douglas, J. T., Rogers, B. E., Rosenfeld, M. E., Michael, S. I., Feng, M., and Curiel, D. T. Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nature Biotech*, 14: 1574-1578, 1996.
 18. Haisma, H. J., Pinedo, H. M., Rijswijk, A., der Meulen-Muileman, I., Sosnowski, B. A., Ying, W., Beusechem, V. W., Tillman, B. W., Gerritsen, W. R., and Curiel, D. T. Tumor-specific gene transfer via an adenoviral vector targeted to the pan-carcinoma antigen EpCAM. *Gene Ther*, 6: 1469-1474., 1999.
 19. Kelly, F. J., Miller, C. R., Buchsbaum, D. J., Gomez-Navarro, J., Barnes, M. N., Alvarez, R. D., and Curiel, D. T. Selectivity of TAG-72 targeted adenovirus gene transfer to primary ovarian carcinoma cells versus autologous mesothelial cells in vitro. *Clin Cancer Res*, 6: 4323-4333, 2000.
 20. Reynolds, P. N., Zinn, K. R., Gavrilyuk, V. D., Balyasnikova, I. V., Rogers, B. E., Buchsbaum, D. J., Wang, M. H., Miletich, D. J., Grizzle, W. E., Douglas, J. T., Danilov, S. M., and Curiel, D. T. A Targetable, Injectable Adenoviral Vector for Selective Gene Delivery to Pulmonary Endothelium in Vivo. *Mol Ther*, 2: 562-578, 2000.
 21. Goldman, C. K., Rogers, B. E., Douglas, J. T., Sosnowski, B. A., Ying, W., Siegal, G. P., Baird, A., Campaign, J. A., and Curiel, D. T. Targeted gene delivery to Kaposi's sarcoma cells via the fibroblast growth factor receptor. *Cancer Res*, 57: 1447-1451, 1997.
 22. Tillman, B. W., de Gruijl, T. D., Luykx-de Bakker, S. A., Scheper, R. J., Pinedo, H. M., Curiel, T. J., Gerritsen, W. R., and Curiel, D. T. Maturation of dendritic cells accompanies high-efficiency gene transfer by a CD40-targeted adenoviral vector. *Journal of Immunology*, 162: 6378-6383, 1999.
 23. Wesseling, J. G., Bosma, P. J., Krasnykh, V., Kashentseva, E. A., Blackwell, J. L., Reynolds, P. N., Li, H., Parameshwar, M., Vickers, S. M., Jaffee, E. M., Huibregtse, K., Curiel, D. T., and Dmitriev, I. Improved gene transfer efficiency to primary and established human pancreatic carcinoma target cells via epidermal growth factor receptor and integrin-targeted adenoviral vectors. *Gene Ther*, 8: 969-976., 2001.

24. Dmitriev, I., Kashentseva, E., Rogers, B. E., Krasnykh, V., and Curiel, D. T. Ectodomain of coxsackievirus and adenovirus receptor genetically fused to epidermal growth factor mediates adenovirus targeting to epidermal growth factor receptor-positive cells. *J Virol*, 74: 6875-6884, 2000.
25. Kanerva, A., Wang, M., Bauerschmitz, G. J., Lam, J. T., Desmond, R. A., Bhoola, S. M., Barnes, M. N., Alvarez, R. D., Siegal, G. P., Curiel, D. T., and Hemminki, A. Gene transfer to ovarian cancer versus normal tissues with fiber-modified adenoviruses. *Mol Ther*, 5: 695-704, 2002.
26. Kanerva, A., Mikheeva, G. V., Krasnykh, V., Coolidge, C. J., Lam, J. T., Mahasreshti, P. J., Barker, S. D., Straughn, M., Barnes, M. N., Alvarez, R. D., Hemminki, A., and Curiel, D. T. Targeting adenovirus to the serotype 3 receptor increases gene transfer efficiency to ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*, 8: 275-280, 2002.
27. Tanaka, T., Kanai, F., Lan, K. H., Ohashi, M., Shiratori, Y., Yoshida, Y., Hamada, H., and Omata, M. Adenovirus-mediated gene therapy of gastric carcinoma using cancer-specific gene expression in vivo. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 231: 775-779, 1997.
28. Yamamoto, M., Alemany, R., Adachi, Y., Grizzle, W. E., and Curiel, D. T. Characterization of the cyclooxygenase-2 promoter in an adenoviral vector and its application for the mitigation of toxicity in suicide gene therapy of gastrointestinal cancers. *Mol Ther*, 3: 385-394, 2001.
29. Bauerschmitz, G. J., Guse, K., Kanerva, A., Menzel, A., Herrmann, I., Desmond, R. A., Yamamoto, M., Nettelbeck, D. M., Hakkarainen, T., Dall, P., Curiel, D. T., and Hemminki, A. Triple-targeted oncolytic adenoviruses featuring the *cox2* promoter, E1A transcomplementation, and serotype chimerism for enhanced selectivity for ovarian cancer cells. *Mol Ther*, 14: 164-174, 2006.
30. Lehnert, M. Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. *Eur J Cancer*, 32A: 912-920, 1996.
31. Holzmayer TA, H. S., von Hoff DD, Roninson IB Clinical Correlates of MDR1 (P-Glycoprotein) Gene Expression in Ovarian and Small-cell Lung Carcinomas. *J Natl Cancer Inst*, 84(19): 1486-1491, 1992.

32. Baekelandt MM, H. R., Nesland JM, Tropr CG, Kristensen GB P-Glycoprotein Expression is a Marker for Chemotherapy Resistance and Prognosis in Advanced Ovarian Cancer. *Anticancer Res*, 20: 1061-1067, 2000.
33. Walther, W., Wendt, J., and Stein, U. Employment of the *mdr1* promoter for the chemotherapy-inducible expression of therapeutic genes in cancer gene therapy. *Gene Therapy*, 4: 544-552, 1997.
34. 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. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, 274: 373-376, 1996.
35. Heise, C., Sampson-Johannes, A., Williams, A., McCormick, F., Von Hoff, D. D., and Kirn, D. H. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents [see comments]. *Nat Med*, 3: 639-645, 1997.
36. Heise, C. C., Williams, A. M., Xue, S., Propst, M., and Kirn, D. H. Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy. *Cancer Research*, 59: 2623-2628, 1999.
37. Rogulski, K. R., Freytag, S. O., Zhang, K., Gilbert, J. D., Paielli, D. L., Kim, J. H., Heise, C. C., and Kirn, D. H. In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy. *Cancer Research*, 60: 1193-1196, 2000.
38. Khuri, F. R., Nemunaitis, J., Ganly, I., Arseneau, J., Tannock, I. F., Romel, L., Gore, M., Ironside, J., MacDougall, R. H., Heise, C., Randlev, B., Gillenwater, A. M., Bruso, P., Kaye, S. B., Hong, W. K., and Kirn, D. H. 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. *Nature Med*, 6: 879-885, 2000.
39. Lamont, J. P., Nemunaitis, J., Kuhn, J. A., Landers, S. A., and McCarty, T. M. A prospective phase II trial of ONYX-015 adenovirus and chemotherapy in recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck (the Baylor experience). *Annals of Surgical Oncology*, 7: 588-592, 2000.
40. Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P. S., McDonnell, T. J., Mitlianga, P., Shi, Y. X., Levin, V. A., Yung, W. K., and Kyritsis, A. P. A mutant

- oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene*, 19: 2-12, 2000.
41. Suzuki, K., Fueyo, J., Krasnykh, V., Reynolds, P., Curiel, D. T., and Alemany, R. A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency. *Clin Cancer Res*, 7: 120-126, 2001.
 42. Doronin, K., Toth, K., Kuppuswamy, M., Ward, P., Tollefson, A. E., and Wold, W. S. Tumor-specific, replication-competent adenovirus vectors overexpressing the adenovirus death protein. *J Virol*, 74: 6147-6155, 2000.
 43. Barker, S. D., Casado, E., Gomez-Navarro, J., Xiang, J., Arafat, W., Mahasreshti, P., Pustilnik, T. B., Hemminki, A., Siegal, G. P., Alvarez, R. D., and Curiel, D. T. An immunomagnetic-based method for the purification of ovarian cancer cells from patient-derived ascites. *Gynecol Oncol*, 82: 57-63., 2001.
 44. Lam, J. T., Kanerva, A., Bauerschmitz, G. J., Barker, S. D., Straughn, M. J., Wang, M., Blackwell, J. L., Alvarez, R. D., Curiel, D. T., and Hemminki, A. Spheroids as a Three Dimensional Model For Analysis of Replicative Viral Agents on Primary Tumor Cells. *Mol Ther*, 3: S87, 2001.
 45. Hemminki, A., Dmitriev, I., Liu, B., Desmond, R. A., Alemany, R., and Curiel, D. T. Targeting oncolytic adenoviral agents to the epidermal growth factor pathway with a secretory fusion molecule. *Cancer Res*, 61: 6377-6381, 2001.
 46. Hemminki, A., Belousova, N., Zinn, K. R., Liu, B., Wang, M., Chaudhuri, T. R., Rogers, B. E., Buchsbaum, D. J., Siegal, G. P., Barnes, M. N., Gomez-Navarro, J., Curiel, D. T., and Alvarez, R. D. An adenovirus with enhanced infectivity mediates molecular chemotherapy of ovarian cancer cells and allows imaging of gene expression. *Mol Ther*, 4: 223-231, 2001.
 47. Abu-Jawdeh, G. M., Faix, J. D., Niloff, J., Tognazzi, K., Manseau, E., Dvorak, H. F., and Brown, L. F. Strong expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ovarian borderline and malignant neoplasms. *Lab Invest*, 74: 1105-1115, 1996.
 48. Masood, R., Cai, J., Zheng, T., Smith, D. L., Hinton, D. R., and Gill, P. S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood*, 98: 1904-1913, 2001.
 49. Damjanov, I. Teratocarcinoma: neoplastic lessons about normal embryogenesis. *Int J Dev Biol*, 37: 39-46, 1993.

50. Bednarz, J., Weich, H. A., Rodokanaki-von Schrenck, A., and Engelmann, K. [Effect of differentiation on expression of genes for growth factors and growth factor receptors in human corneal endothelial cells]. *Ophthalmologe*, 93: 268-274, 1996.
51. Bednarz, J., Weich, H. A., Rodokanaki-von Schrenck, A., and Engelmann, K. Expression of genes coding growth factors and growth factor receptors in differentiated and dedifferentiated human corneal endothelial cells. *Cornea*, 14: 372-381, 1995.
52. Imperiale, M. J., Kao, H. T., Feldman, L. T., Nevins, J. R., and Strickland, S. Common control of the heat shock gene and early adenovirus genes: evidence for a cellular E1A-like activity. *Mol Cell Biol*, 4: 867-874, 1984.
53. Werling, U., Siehler, S., Litfin, M., Nau, H., and Gottlicher, M. Induction of differentiation in F9 cells and activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta by valproic acid and its teratogenic derivatives. *Mol Pharmacol*, 59: 1269-1276, 2001.
54. Kirn, D. Clinical research results with dl1520 (Onyx-015), a replication-selective adenovirus for the treatment of cancer: what have we learned? *Gene Ther*, 8: 89-98, 2001.
55. Heise, C., Hermiston, T., Johnson, L., Brooks, G., Sampson-Johannes, A., Williams, A., Hawkins, L., and Kirn, D. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nature Med*, 6: 1134-1139, 2000.
56. Wickham, T. J., Lee, G. M., Titus, J. A., Sconocchia, G., Bakacs, T., Kovessi, I., and Segal, D. M. Targeted adenovirus-mediated gene delivery to T cells via CD3. *J Virol*, 71: 7663-7669, 1997.
57. Goossens, P. H., Havenga, M. J., Pieterman, E., Lemckert, A. A., Breedveld, F. C., Bout, A., and Huizinga, T. W. Infection efficiency of type 5 adenoviral vectors in synovial tissue can be enhanced with a type 16 fiber. *Arthritis Rheum*, 44: 570-577, 2001.
58. Schranz, V., Kulcsar, G., Dan, P., Horvath, J., Nasz, I., Barinsky, I. F., and Ugryumov, E. P. Interaction of human lymphocytes and viruses in vitro. *Acta Microbiol Acad Sci Hung*, 26: 1-9, 1979.

59. Chen, Z., Ahonen, M., Hamalainen, H., Bergelson, J. M., Kahari, V. M., and Lahesmaa, R. High-efficiency gene transfer to primary T lymphocytes by recombinant adenovirus vectors. *J Immunol Methods*, 260: 79-89, 2002.
60. Horvath, J., Kulcsar, G., Ugryumov, J. P., Das, P., Nasz, I., Barinsky, I. F., Simon, G., and Ongradi, J. Effect of adenovirus infection on human peripheral lymphocytes. *Acta Microbiol Hung*, 30: 203-209, 1983.
61. Higginbotham, J. N., Seth, P., Blaese, R. M., and Ramsey, W. J. The release of inflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells in vitro following exposure to adenovirus variants and capsid. *Hum Gene Ther*, 13: 129-141, 2002.
62. Grover, C. B., Jr. Disorders of Neutrophil Production/Leukopenia. *In: J. C. P. F. Bennett (ed.), Cecil Textbook of Medicine, Vol. 20, pp. 908-915. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: W.B. Saunders Company, 1996.*
63. Thomas, M. A., Spencer, J. F., La Regina, M. C., Dhar, D., Tollefson, A. E., Toth, K., and Wold, W. S. Syrian hamster as a permissive immunocompetent animal model for the study of oncolytic adenovirus vectors. *Cancer Res*, 66: 1270-1276, 2006.
64. Jogler, C., Hoffmann, D., Theegarten, D., Grunwald, T., Uberla, K., and Wildner, O. Replication properties of human adenovirus in vivo and in cultures of primary cells from different animal species. *J Virol*, 80: 3549-3558, 2006.
65. DeWeese, T. L., van der Poel, H., Li, S., Mikhak, B., Drew, R., Goemann, M., Hamper, U., DeJong, R., Detorie, N., Rodriguez, R., Haulk, T., DeMarzo, A. M., Piantadosi, S., Yu, D. C., Chen, Y., Henderson, D. R., Carducci, M. A., Nelson, W. G., and Simons, J. W. A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Res*, 61: 7464-7472, 2001.
66. Tao, N., Gao, G. P., Parr, M., Johnston, J., Baradet, T., Wilson, J. M., Barsoum, J., and Fawell, S. E. Sequestration of adenoviral vector by Kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver. *Mol Ther*, 3: 28-35., 2001.
67. Alemany, R., Suzuki, K., and Curiel, D. T. Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *J Gen Virol*, 81 Pt 11: 2605-2609, 2000.

68. Yamamoto, M., Davydova, J., Wang, M., Siegal, G. P., Krasnykh, V., Vickers, S. M., and Curiel, D. T. Infectivity enhanced, cyclooxygenase-2 promoter-based conditionally replicative adenovirus for pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 125: 1203-1218, 2003.
69. Casado, E., Gomez-Navarro, J., Yamamoto, M., Adachi, Y., Coolidge, C. J., Arafat, W. O., Barker, S. D., Wang, M. H., Mahasreshti, P. J., Hemminki, A., Gonzalez-Baron, M., Barnes, M. N., Pustilnik, T. B., Siegal, G. P., Alvarez, R. D., and Curiel, D. T. Strategies to accomplish targeted expression of transgenes in ovarian cancer for molecular therapeutic applications. *Clin Cancer Res*, 7: 2496-2504, 2001.
70. Barker, S. D., Coolidge, C. J., Kanerva, A., Hakkarainen, T., Yamamoto, M., Liu, B., Rivera, A. A., Bhoola, S. M., Barnes, M. N., Alvarez, R. D., Curiel, D. T., and Hemminki, A. The secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) promoter for ovarian cancer gene therapy. *J Gene Med*, 5: 300-310, 2003.
71. Kanerva, A., Bauerschmitz, G. J., Yamamoto, M., Lam, J. T., Alvarez, R. D., Siegal, G. P., Curiel, D. T., and Hemminki, A. A cyclooxygenase-2 promoter-based conditionally replicating adenovirus with enhanced infectivity for treatment of ovarian adenocarcinoma. *Gene Ther*, 11: 552-559, 2004.
72. Nettelbeck, D. M., Rivera, A. A., Balague, C., Alemany, R., and Curiel, D. T. Novel Oncolytic Adenoviruses Targeted to Melanoma: Specific Viral Replication and Cytolysis by Expression of E1A Mutants from the Tyrosinase Enhancer/Promoter. *Cancer Res*, 62: 4663-4670, 2002.
73. Kanerva, A., Zinn, K. R., Chaudhuri, T. R., Lam, J. T., Suzuki, K., Uil, T. G., Hakkarainen, T., Bauerschmitz, G. J., Wang, M., Liu, B., Cao, Z., Alvarez, R. D., Curiel, D. T., and Hemminki, A. Enhanced therapeutic efficacy for ovarian cancer with a serotype 3 receptor-targeted oncolytic adenovirus. *Mol Ther*, 8: 449-458, 2003.
74. Lam, J. T., Bauerschmitz, G. J., Kanerva, A., Barker, S. D., Straughn, J. M., Wang, M., Barnes, M. N., Blackwell, J. L., Siegal, G. P., Alvarez, R. D., Curiel, D. T., and Hemminki, A. Replication of an integrin targeted conditionally replicating adenovirus on primary ovarian cancer spheroids. *Cancer Gene Ther*, 10: 377-387, 2003.
75. Lam, J. T., Kanerva, A., Bauerschmitz, G. J., Takayama, K., Suzuki, K., Yamamoto, M., Bhoola, S. M., Liu, B., Wang, M., Barnes, M. N., Alvarez, R.

- D., Siegal, G. P., Curiel, D. T., and Hemminki, A. Inter-patient variation in efficacy of five oncolytic adenovirus candidates for ovarian cancer therapy. *J Gene Med*, 6: 1333-1342, 2004.
76. Balague, C., Noya, F., Alemany, R., Chow, L. T., and Curiel, D. T. Human papillomavirus E6E7-mediated adenovirus cell killing: selectivity of mutant adenovirus replication in organotypic cultures of human keratinocytes. *J Virol*, 75: 7602-7611, 2001.
77. Raki, M., Kanerva, A., Ristimäki, A., Desmond, R. A., Chen, D. T., Ranki, T., Sarkioja, M., Kangasniemi, L., and Hemminki, A. Combination of gemcitabine and Ad5/3-Delta24, a tropism modified conditionally replicating adenovirus, for the treatment of ovarian cancer. *Gene Ther*, 12: 1198-1205, 2005.
78. Von Seggern, D. J., Huang, S., Fleck, S. K., Stevenson, S. C., and Nemerow, G. R. Adenovirus vector pseudotyping in fiber-expressing cell lines: improved transduction of Epstein-Barr virus-transformed B cells. *J Virol*, 74: 354-362, 2000.
79. Krasnykh, V. N., Mikheeva, G. V., Douglas, J. T., and Curiel, D. T. Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *Journal of Virology*, 70: 6839-6846, 1996.
80. Sirena, D., Lilienfeld, B., Eisenhut, M., Kalin, S., Boucke, K., Beerli, R. R., Vogt, L., Ruedl, C., Bachmann, M. F., Greber, U. F., and Hemmi, S. The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J Virol*, 78: 4454-4462, 2004.
81. Marttila, M., Persson, D., Gustafsson, D., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P., Wadell, G., and Arnberg, N. CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J Virol*, 79: 14429-14436, 2005.
82. Tuve, S., Wang, H., Ware, C., Liu, Y., Gaggar, A., Bernt, K., Shayakhmetov, D., Li, Z., Strauss, R., Stone, D., and Lieber, A. A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells. *J Virol*, 2006.
83. Alemany, R., Balague, C., and Curiel, D. T. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol*, 18: 723-727, 2000.
84. Wu, E., Fernandez, J., Fleck, S. K., Von Seggern, D. J., Huang, S., and Nemerow, G. R. A 50-kDa membrane protein mediates sialic acid-

- independent binding and infection of conjunctival cells by adenovirus type 37. *Virology*, 279: 78-89, 2001.
85. Hortobagyi, G. N., Ueno, N. T., Xia, W., Zhang, S., Wolf, J. K., Putnam, J. B., Weiden, P. L., Willey, J. S., Carey, M., Branham, D. L., Payne, J. Y., Tucker, S. D., Bartholomeusz, C., Kilbourn, R. G., De Jager, R. L., Sneige, N., Katz, R. L., Anklesaria, P., Ibrahim, N. K., Murray, J. L., Theriault, R. L., Valero, V., Gershenson, D. M., Bevers, M. W., Huang, L., Lopez-Berestein, G., and Hung, M. C. Cationic liposome-mediated E1A gene transfer to human breast and ovarian cancer cells and its biologic effects: a phase I clinical trial. *J Clin Oncol*, 19: 3422-3433, 2001.
86. Bauerschmitz, G. J., Kanerva, A., Wang, M., Herrmann, I., Shaw, D. R., Strong, T. V., Desmond, R., Rein, D. T., Dall, P., Curiel, D. T., and Hemminki, A. Evaluation of a selectively oncolytic adenovirus for local and systemic treatment of cervical cancer. *Int J Cancer*, 111: 303-309, 2004.
87. Raper, S. E., Chirmule, N., Lee, F. S., Wivel, N. A., Bagg, A., Gao, G. P., Wilson, J. M., and Batshaw, M. L. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*, 80: 148-158, 2003.
88. Cancer Facts & Figures 2003. http://www.cancer.org/docroot/STT/content/STT_1x_Cancer_Facts_Figures_2003.asp; American Cancer Society, 2003.
89. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., and Thun, M. J. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*, 56: 106-130, 2006.
90. Marnitz, S., Kohler, C., Muller, M., Behrens, K., Hasenbein, K., and Schneider, A. Indications for primary and secondary exenterations in patients with cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 103: 1023-1030, 2006.
91. Ozols, R. F. Systemic therapy for ovarian cancer: current status and new treatments. *Semin Oncol*, 33: S3-11, 2006.
92. Ozols, R. F. Challenges for chemotherapy in ovarian cancer. *Ann Oncol*, 17 Suppl 5: v181-v187, 2006.
93. Markman, M. and Walker, J. L. Intraperitoneal chemotherapy of ovarian cancer: a review, with a focus on practical aspects of treatment. *J Clin Oncol*, 24: 988-994, 2006.

94. Ozols, R. F., Bookman, M. A., and Young, R. C. Intraperitoneal chemotherapy for ovarian cancer. *N Engl J Med*, 354: 1641-1643; author reply 1641-1643, 2006.
95. Armstrong, D. K., Bundy, B., Wenzel, L., Huang, H. Q., Baergen, R., Lele, S., Copeland, L. J., Walker, J. L., and Burger, R. A. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med*, 354: 34-43, 2006.
96. Darcy, K. M. and Schilder, R. J. Relevant molecular markers and targets. *Gynecol Oncol*, 103: S6-S13, 2006.
97. Chon, H. S., Hu, W., and Kavanagh, J. J. Targeted therapies in gynecologic cancers. *Curr Cancer Drug Targets*, 6: 333-363, 2006.
98. Hemminki, A. From molecular changes to customised therapy. *Eur J Cancer*, 38: 333-338, 2002.
99. Cross, D. and Burmester, J. K. Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clin Med Res*, 4: 218-227, 2006.
100. Vorburger, S. A. and Hunt, K. K. Adenoviral gene therapy. *Oncologist*, 7: 46-59, 2002.
101. Hauses, M. and Schackert, H. K. [Gene therapy of malignant tumors]. *Zentralbl Chir*, 125 Suppl 1: 41-46, 2000.
102. Nieto, Y., Cagnoni, P. J., Nawaz, S., Shpall, E. J., Yerushalmi, R., Cook, B., Russell, P., McDermit, J., Murphy, J., Bearman, S. I., and Jones, R. B. Evaluation of the predictive value of Her-2/neu overexpression and p53 mutations in high-risk primary breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*, 18: 2070-2080, 2000.
103. Casado, E., Nettelbeck, D. M., Gomez-Navarro, J., Hemminki, A., Gonzalez Baron, M., Siegal, G. P., Barnes, M. N., Alvarez, R. D., and Curiel, D. T. Transcriptional targeting for ovarian cancer gene therapy. *Gynecol Oncol*, 82: 229-237, 2001.
104. Elshami, A. A., Saavedra, A., Zhang, H., Kucharczuk, J. C., Spray, D. C., Fishman, G. I., Amin, K. M., Kaiser, L. R., and Albelda, S. M. Gap junctions play a role in the 'bystander effect' of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in vitro. *Gene Ther*, 3: 85-92, 1996.
105. Nishida, Y., Maeda, Y., Hara, A., Arima, T., Kimura, E., Yamashita, S., Uyama, E., Mita, S., and Uchino, M. Adenovirus-mediated murine interferon-gamma

- receptor transfer enhances the efficacy of IFN-gamma in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 290: 1042-1047, 2002.
106. Jocham, D., Richter, A., Hoffmann, L., Iwig, K., Fahlenkamp, D., Zakrzewski, G., Schmitt, E., Dannenberg, T., Lehmacher, W., von Wietersheim, J., and Doehn, C. Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: phase III, randomised controlled trial. *Lancet*, 363: 594-599, 2004.
 107. Duverger, V., Sartorius, U., Klein-Bauernschmitt, P., Krammer, P. H., and Schlehofer, J. R. Enhancement of cisplatin-induced apoptosis by infection with adeno-associated virus type 2. *Int J Cancer*, 97: 706-712, 2002.
 108. Schiedlmeier, B., Schilz, A. J., Kuhlcke, K., Laufs, S., Baum, C., Zeller, W. J., Eckert, H. G., and Fruehauf, S. Multidrug resistance 1 gene transfer can confer chemoprotection to human peripheral blood progenitor cells engrafted in immunodeficient mice. *Hum Gene Ther*, 13: 233-242, 2002.
 109. Luther-Wyrsh, A., Costello, E., Thali, M., Buetti, E., Nissen, C., Surbek, D., Holzgreve, W., Gratwohl, A., Tichelli, A., and Wodnar-Filipowicz, A. Stable transduction with lentiviral vectors and amplification of immature hematopoietic progenitors from cord blood of preterm human fetuses. *Hum Gene Ther*, 12: 377-389, 2001.
 110. Pandya, S., Klimatcheva, E., and Planelles, V. Lentivirus and foamy virus vectors: novel gene therapy tools. *Expert Opin Biol Ther*, 1: 17-40, 2001.
 111. Ross, R. W., Wright, M. E., and Tavel, J. A. Ongoing trials of immune-based therapies for HIV infection in adults. *Expert Opin Biol Ther*, 1: 413-424, 2001.
 112. Ponnazhagan, S., Curiel, D. T., Shaw, D. R., Alvarez, R. D., and Siegal, G. P. Adeno-associated virus for cancer gene therapy. *Cancer Res*, 61: 6313-6321, 2001.
 113. Vermeij, J., Zeinoun, Z., Neyns, B., Teugels, E., Bourgain, C., and De Greve, J. Transduction of ovarian cancer cells: a recombinant adeno-associated viral vector compared to an adenoviral vector. *Br J Cancer*, 85: 1592-1599, 2001.
 114. Miller, D. G., Rutledge, E. A., and Russell, D. W. Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat Genet*, 30: 147-148, 2002.
 115. Rochlitz, C. F. Gene therapy of cancer. *Swiss Med Wkly*, 131: 4-9, 2001.

116. Lee, S. G., Yoon, S. J., Kim, C. D., Kim, K., Lim, D. S., Yeom, Y. I., Sung, M. W., Heo, D. S., and Kim, N. K. Enhancement of adenoviral transduction with polycationic liposomes in vivo. *Cancer Gene Ther*, 7: 1329-1335, 2000.
117. Yoo, G. H., Hung, M. C., Lopez-Berestein, G., LaFollette, S., Ensley, J. F., Carey, M., Batson, E., Reynolds, T. C., and Murray, J. L. Phase I trial of intratumoral liposome E1A gene therapy in patients with recurrent breast and head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 7: 1237-1245, 2001.
118. Wang, S. C., Zhang, L., Hortobagyi, G. N., and Hung, M. C. Targeting HER2: recent developments and future directions for breast cancer patients. *Semin Oncol*, 28: 21-29, 2001.
119. Meier, O. and Greber, U. F. Adenovirus endocytosis. *J Gene Med*, 5: 451-462, 2003.
120. Nalbantoglu, J., Larochele, N., Wolf, E., Karpati, G., Lochmuller, H., and Holland, P. C. Muscle-specific overexpression of the adenovirus primary receptor CAR overcomes low efficiency of gene transfer to mature skeletal muscle. *J Virol*, 75: 4276-4282, 2001.
121. Zabner, J., Freimuth, P., Puga, A., Fabrega, A., and Welsh, M. J. Lack of high affinity fiber receptor activity explains the resistance of ciliated airway epithelia to adenovirus infection. *J Clin Invest*, 100: 1144-1149., 1997.
122. Walters, R. W., Grunst, T., Bergelson, J. M., Finberg, R. W., Welsh, M. J., and Zabner, J. Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J Biol Chem*, 274: 10219-10226., 1999.
123. Kaner, R. J., Worgall, S., Leopold, P. L., Stolze, E., Milano, E., Hidaka, C., Ramalingam, R., Hackett, N. R., Singh, R., Bergelson, J., Finberg, R., Falck-Pedersen, E., and Crystal, R. G. Modification of the genetic program of human alveolar macrophages by adenovirus vectors in vitro is feasible but inefficient, limited in part by the low level of expression of the coxsackie/adenovirus receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20: 361-370., 1999.
124. Wan, Y. Y., Leon, R. P., Marks, R., Cham, C. M., Schaack, J., Gajewski, T. F., and DeGregori, J. Transgenic expression of the coxsackie/adenovirus receptor enables adenoviral-mediated gene delivery in naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 13784-13789., 2000.

125. Cohen, C. J., Shieh, J. T., Pickles, R. J., Okegawa, T., Hsieh, J. T., and Bergelson, J. M. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 15191-15196, 2001.
126. Shayakhmetov, D. M., Li, Z. Y., Ni, S., and Lieber, A. Targeting of adenovirus vectors to tumor cells does not enable efficient transduction of breast cancer metastases. *Cancer Res*, 62: 1063-1068, 2002.
127. Reynolds, P., Dmitriev, I., and Curiel, D. Insertion of an RGD motif into the HI loop of adenovirus fiber protein alters the distribution of transgene expression of the systemically administered vector. *Gene Ther*, 6: 1336-1339, 1999.
128. Wood, M., Perrotte, P., Onishi, E., Harper, M. E., Dinney, C., Pagliaro, L., and Wilson, D. R. Biodistribution of an adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to a mouse. *Cancer Gene Ther*, 6: 367-372., 1999.
129. Bilbao, R., Gerolami, R., Bralet, M. P., Qian, C., Tran, P. L., Tennant, B., Prieto, J., and Brechot, C. Transduction efficacy, antitumoral effect, and toxicity of adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir therapy of hepatocellular carcinoma: the woodchuck animal model. *Cancer Gene Ther*, 7: 657-662, 2000.
130. Huard, J., Lochmuller, H., Acsadi, G., Jani, A., Massie, B., and Karpati, G. The route of administration is a major determinant of the transduction efficiency of rat tissues by adenoviral recombinants. *Gene Ther*, 2: 107-115, 1995.
131. van der Eb, M. M., Cramer, S. J., Vergouwe, Y., Schagen, F. H., van Krieken, J. H., van der Eb, A. J., Rinkes, I. H., van de Velde, C. J., and Hoeben, R. C. Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir administration. *Gene Ther*, 5: 451-458, 1998.
132. Vanderkwaak, T. J., Wang, M., Gomez-Navarro, J., Rancourt, C., Dmitriev, I., Krasnykh, V., Barnes, M., Siegal, G. P., Alvarez, R., and Curiel, D. T. An advanced generation of adenoviral vectors selectively enhances gene transfer for ovarian cancer gene therapy approaches. *Gynecol Oncol*, 74: 227-234, 1999.
133. Khuu, H., Conner, M., Vanderkwaak, T., Shultz, J., Gomez-Navarro, J., Alvarez, R., Curiel, D. T., and Siegal, G. P. Detection of coxsackie-adenovirus

- receptor (CAR) immunoreactivity in ovarian tumors of epithelial derivation. *Appl Immunohistochem Molec Morphol*, 7: 266-270, 1999.
134. Dodson, J., DeMarzo, A., Schoenberg, M., Feneley, M., and Rodriguez, R. Coxsackie adenovirus receptor immunohistochemical staining in superficial bladder tumors. *Mol Ther*, 1: S123, 2000.
 135. Hemmi, S., Geertsen, R., Mezzacasa, A., Peter, I., and Dummer, R. The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. *Hum Gene Ther*, 9: 2363-2373, 1998.
 136. Hemminki, A. and Alvarez, R. D. Adenoviruses in oncology: a viable option? *BioDrugs*, 16: 77-87, 2002.
 137. Anders M., D. R. X., Lipner E.M., Balmain A., McCormick F., and Korn W.M. Inhibition of the MAPK pathway Up-Regulates the Human Coxsackie and Adenovirus Receptor (CAR) and Increases the Infectivity of Cancer Cells with Adenovirus. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 42: 703, 2001.
 138. Vile, R. G., Sunassee, K., and Diaz, R. M. Strategies for achieving multiple layers of selectivity in gene therapy. *Mol Med Today*, 4: 84-92, 1998.
 139. Vassaux, G. New cloning tools for the design of better transgenes. *Gene Therapy*, 6: 307-308, 1999.
 140. Miller, N. and Whelan, J. Progress in transcriptionally targeted and regulatable vectors for genetic therapy. *Hum Gene Ther*, 8: 803-815, 1997.
 141. Hart, I. R. Tissue specific promoters in targeting systemically delivered gene therapy. *Seminars in Oncology*, 23: 154-158, 1996.
 142. Russell, W. C. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*, 81: 2573-2604, 2000.
 143. Volpers, C. and Kochanek, S. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med*, 6 *Suppl 1*: S164-171, 2004.
 144. Database, C. T. <http://www.clinicaltrials.gov/ct/action/GetStudy>. 2006.
 145. Schreiber, S., Kampgen, E., Wagner, E., Pirkhammer, D., Trcka, J., Korschan, H., Lindemann, A., Dorffner, R., Kittler, H., Kasteliz, F., Kupcu, Z., Sinski, A., Zatloukal, K., Buschle, M., Schmidt, W., Birnstiel, M., Kempe, R. E., Voigt, T., Weber, H. A., Pehamberger, H., Mertelsmann, R., Brocker, E. B., Wolff, K., and Stingl, G. Immunotherapy of metastatic malignant melanoma by a vaccine

- consisting of autologous interleukin 2-transfected cancer cells: outcome of a phase I study. *Human Gene Therapy*, 10: 983-993, 1999.
146. Mincheff, M., Tchakarov, S., Zoubak, S., Loukinov, D., Botev, C., Altankova, I., Georgiev, G., Petrov, S., and Meryman, H. T. Naked DNA and adenoviral immunizations for immunotherapy of prostate cancer: A phase I/II clinical trial. *European Urology*, 38: 208-217, 2000.
 147. Stephenson, J. R. Genetically modified viruses: vaccines by design. *Curr Pharm Biotechnol*, 2: 47-76, 2001.
 148. Shiver, J. W., Fu, T. M., Chen, L., Casimiro, D. R., Davies, M. E., Evans, R. K., Zhang, Z. Q., Simon, A. J., Trigona, W. L., Dubey, S. A., Huang, L., Harris, V. A., Long, R. S., Liang, X., Handt, L., Schleif, W. A., Zhu, L., Freed, D. C., Persaud, N. V., Guan, L., Punt, K. S., Tang, A., Chen, M., Wilson, K. A., Collins, K. B., Heidecker, G. J., Fernandez, V. R., Perry, H. C., Joyce, J. G., Grimm, K. M., Cook, J. C., Keller, P. M., Kresock, D. S., Mach, H., Troutman, R. D., Isopi, L. A., Williams, D. M., Xu, Z., Bohannon, K. E., Volkin, D. B., Montefiori, D. C., Miura, A., Krivulka, G. R., Lifton, M. A., Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Letvin, N. L., Caulfield, M. J., Bett, A. J., Youil, R., Kaslow, D. C., and Emini, E. A. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature*, 415: 331-335, 2002.
 149. Sandmair, A. M., Loimas, S., Puranen, P., Immonen, A., Kossila, M., Puranen, M., Hurskainen, H., Tyynela, K., Turunen, M., Vanninen, R., Lehtolainen, P., Paljarvi, L., Johansson, R., Vapalahti, M., and Yla-Herttuala, S. Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum Gene Ther*, 11: 2197-2205, 2000.
 150. Trask, T. W., Trask, R. P., Aguilar-Cordova, E., Shine, H. D., Wyde, P. R., Goodman, J. C., Hamilton, W. J., Rojas-Martinez, A., Chen, S. H., Woo, S. L., and Grossman, R. G. Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with current malignant brain tumors. *Mol Ther*, 1: 195-203., 2000.
 151. Eck, S. L., Alavi, J. B., Alavi, A., Davis, A., Hackney, D., Judy, K., Mollman, J., Phillips, P. C., Wheeldon, E. B., and Wilson, J. M. Treatment of advanced CNS malignancies with the recombinant adenovirus H5.010RSVTK: a phase I trial. *Human Gene Therapy*, 7: 1465-1482, 1996.

152. Alvarez, R. D. and Curiel, D. T. A phase I study of recombinant adenovirus vector-mediated intraperitoneal delivery of herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) gene and intravenous ganciclovir for previously treated ovarian and extraovarian cancer patients. *Human Gene Therapy*, 8: 597-613, 1997.
153. Alvarez, R. D., Gomez-Navarro, J., Wang, M., Barnes, M. N., Strong, T. V., Arani, R. B., Arafat, W., Hughes, J. V., Siegal, G. P., and Curiel, D. T. Adenoviral-mediated suicide gene therapy for ovarian cancer. *Mol Ther*, 2: 524-530, 2000.
154. Hasenburger, A., Tong, X. W., Rojas-Martinez, A., Nyberg-Hoffman, C., Kieback, C. C., Kaplan, A., Kaufman, R. H., Ramzy, I., Aguilar-Cordova, E., and Kieback, D. G. Thymidine kinase gene therapy with concomitant topotecan chemotherapy for recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther*, 7: 839-844, 2000.
155. Koeneman, K. S., Kao, C., Ko, S. C., Yang, L., Wada, Y., Kallmes, D. F., Gillenwater, J. Y., Zhou, H. E., Chung, L. W., and Gardner, T. A. Osteocalcin-directed gene therapy for prostate-cancer bone metastasis. *World J Urol*, 18: 102-110, 2000.
156. Herman, J. R., Adler, H. L., Aguilar-Cordova, E., Rojas-Martinez, A., Woo, S., Timme, T. L., Wheeler, T. M., Thompson, T. C., and Scardino, P. T. In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial. *Human Gene Therapy*, 10: 1239-1249, 1999.
157. Serman, D. H., Treat, J., Litzky, L. A., Amin, K. M., Coonrod, L., Molnar-Kimber, K., Recio, A., Knox, L., Wilson, J. M., Albelda, S. M., and Kaiser, L. R. Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. *Human Gene Therapy*, 9: 1083-1092, 1998.
158. Immonen, A., Vapalahti, M., Tynnela, K., Hurskainen, H., Sandmair, A., Vanninen, R., Langford, G., Murray, N., and Yla-Herttuala, S. AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol Ther*, 10: 967-972, 2004.
159. Hasenburger, A., Tong, X. W., Fischer, D. C., Rojas-Martinez, A., Nyberg-Hoffman, C., Kaplan, A. L., Kaufman, R. H., Ramzy, I., Aguilar-Cordova, E., and Kieback, D. G. Adenovirus-mediated thymidine kinase gene therapy in

- combination with topotecan for patients with recurrent ovarian cancer: 2.5-year follow-up. *Gynecol Oncol*, *83*: 549-554, 2001.
160. Teh, B. S., Aguilar-Cordova, E., Kernen, K., Chou, C. C., Shalev, M., Vlachaki, M. T., Miles, B., Kadmon, D., Mai, W. Y., Caillouet, J., Davis, M., Ayala, G., Wheeler, T., Brady, J., Carpenter, L. S., Lu, H. H., Chiu, J. K., Woo, S. Y., Thompson, T., and Butler, E. B. Phase I/II trial evaluating combined radiotherapy and in situ gene therapy with or without hormonal therapy in the treatment of prostate cancer--a preliminary report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, *51*: 605-613, 2001.
 161. Aguilar LK, T. B., Vlachaki MT, Ayala G, Wheeler T, Mai WY, Caillouet J, Davis M, Carpender LS, Lu HH, Chiu JK, Woo SY, Miles B, Kadmon D, Thompson T, Butler EB, Aguilar-Cordova E Adv-tk/valacyclovir gene therapy in combination with radiotherapy for prostate cancer: interim results of a phase I/II clinical trial. *Proc of ASCO*, *21*: 7a, 2002.
 162. Schuler, M., Rochlitz, C., Horowitz, J. A., Schlegel, J., Perruchoud, A. P., Kommos, F., Bolliger, C. T., Kauczor, H. U., Dalquen, P., Fritz, M. A., Swanson, S., Herrmann, R., and Huber, C. A phase I study of adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Human Gene Therapy*, *9*: 2075-2082, 1998.
 163. Kauczor, H. U., Schuler, M., Heussel, C. P., von Weymarn, A., Bongartz, G., Rochlitz, C., Huber, C., and Thelen, M. CT-guided intratumoral gene therapy in non-small-cell lung cancer. *European Radiology*, *9*: 292-296, 1999.
 164. 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, J. B., Jr., Richli, W. R., Savin, M., Waugh, M. K., and et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *91*: 763-771, 1999.
 165. Pisters, L. L., McDonnell, T. J., Troncso, P., Brisbay, S., Hossan, E., and al., e. Intraprostatic Ad-p53 Gene Therapy Induces Apoptosis in Locally Advanced Adenocarcinoma of the Prostate. *Proc Am Soc Clin Oncol*, *20*: A699, 2001.
 166. Hao, D., Rowinsky, E. K., Smetzer, L. A., Ochoa, L., Hammond, L. A., Garner, A., Smith, L., Parker, K., Merritt, J. A., and Tolcher, A. W. A Phase I

- Pharmacokinetic Study of intravenous (IV) p53 Gene Therapy with RPR/INGN-201 in patients (pts) with advanced cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 20: A1045, 2001.
167. Muller, C. Y., Coleman, R. L., Rogers, P., Merritt, J. A., Parker, K., and Miller, D. S. Phase I Intraperitoneal p53 Gene Transfer in Ovarian Cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 20: 257a, 2001.
 168. Pagliaro, L. C., Keyhani, A., Liu, B., Perrotte, P., and al., e. Gene Therapy of Bladder Cancer: Phase I Results with Ad5CMV-p53 (RPR/INGN 201). *Proc Am Soc Clin Oncol*, 20: A799, 2001.
 169. Roth, J. A. Modification of tumor suppressor gene expression and induction of apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) with an adenovirus vector expressing wildtype p53 and cisplatin. *Hum Gene Ther*, 7: 1013-1030., 1996.
 170. Roth, J. A., Swisher, S. G., Merritt, J. A., Lawrence, D. D., Kemp, B. L., Carrasco, C. H., El-Naggar, A. K., Fossella, F. V., Glisson, B. S., Hong, W. K., Khurl, F. R., Kurie, J. M., Nesbitt, J. C., Pisters, K., Putnam, J. B., Schrump, D. S., Shin, D. M., and Walsh, G. L. Gene therapy for non-small cell lung cancer: a preliminary report of a phase I trial of adenoviral p53 gene replacement. *Seminars in Oncology*, 25: 33-37, 1998.
 171. Atencio, I., Warren, R., Venook, A. P., Kemeny, M. M., Staley, C., Fraker, D., and al., e. A phase I clinical trial of intra-arterial adenovirus p53 (SCH58500) gene therapy for colorectal tumors metastatic to the liver. *Mol Ther*, 3: S309, 2001.
 172. Buller, R. E., Shahin, M. S., Karlan, B., Horowitz, J., Mahavni, V., Patrauskas, S., and al., e. Multi-dose intraperitoneal Rad/p53 (SCH58500) Gene Replacement Combined with Chemotherapy in Heavily Pretreated Recurrent Ovarian Cancer is Associated with Prolonged Survival. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 20: 262a, 2001.
 173. Schuler, M., Herrmann, R., De Greve, J. L. P., Stewart, A. K., Gatzemeier, U., Stewart, D. J., Laufman, L., Gralla, R., Kuball, J., Buhl, R., Heussel, C. P., Kommos, F., Perruchoud, A. P., Shepherd, F. A., Fritz, M. A., Horowitz, J. A., Huber, C., and Rochlitz, C. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients receiving chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: Results of a multicenter phase II study. *J Clin Oncol*, 19: 1750-1758, 2001.

174. Patil, S. D., Rhodes, D. G., and Burgess, D. J. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *Aaps J*, 7: E61-77, 2005.
175. Peng, Z. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther*, 16: 1016-1027, 2005.
176. Cunningham C, N. J., Richards D, Tong A, Zhang Y, Su D, Chada S, Mhashilkar A, Zhou-Yang H, Parker K, Wilson D, Merritt J, Coffee K A phase I dose-escalation pharmacokinetic and pharmacodynamic study of INGN 241 (Ad-mda7) in patients with advanced solid tumors. *Proc of ASCO*, 21: 23a, 2002.
177. Alvarez, R. D. and Curiel, D. T. A phase I study of recombinant adenovirus vector-mediated delivery of an anti-erbB-2 single-chain (sFv) antibody gene for previously treated ovarian and extraovarian cancer patients. *Human Gene Therapy*, 8: 229-242, 1997.
178. Alvarez, R. D., Barnes, M. N., Gomez-Navarro, J., Wang, M., Strong, T. V., Arafat, W., Arani, R. B., Johnson, M. R., Roberts, B. L., Siegal, G. P., and Curiel, D. T. A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial. *Clin Cancer Res*, 6: 3081-3087, 2000.
179. Tanaka, T., Kanai, F., Okabe, S., Yoshida, Y., Wakimoto, H., Hamada, H., Shiratori, Y., Lan, K., Ishitobi, M., and Omata, M. Adenovirus-mediated prodrug gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human gastric carcinoma cells in vitro. *Cancer Res*, 56: 1341-1345, 1996.
180. Osaki, T., Tanio, Y., Tachibana, I., Hosoe, S., Kumagai, T., Kawase, I., Oikawa, S., and Kishimoto, T. Gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing human lung cancer cells by cell type-specific expression of herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Cancer Res*, 54: 5258-5261, 1994.
181. Lan, K. H., Kanai, F., Shiratori, Y., Ohashi, M., Tanaka, T., Okudaira, T., Yoshida, Y., Hamada, H., and Omata, M. In vivo selective gene expression and therapy mediated by adenoviral vectors for human carcinoembryonic antigen-producing gastric carcinoma. *Cancer Res*, 57: 4279-4284, 1997.
182. Brand, K., Loser, P., Arnold, W., Bartels, T., and Strauss, M. Tumor cell-specific transgene expression prevents liver toxicity of the adeno-HSVtk/GCV approach. *Gene Therapy*, 5: 1363-1371, 1998.

183. Kanai, F., Lan, K. H., Shiratori, Y., Tanaka, T., Ohashi, M., Okudaira, T., Yoshida, Y., Wakimoto, H., Hamada, H., Nakabayashi, H., Tamaoki, T., and Omata, M. In vivo gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene. *Cancer Res*, 57: 461-465, 1997.
184. Chung, I., Schwartz, P. E., Crystal, R. G., Pizzorno, G., Leavitt, J., and Deisseroth, A. B. 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 Therapy*, 6: 99-106, 1999.
185. Peng, X. Y., Won, J. H., Rutherford, T., Fujii, T., Zelterman, D., Pizzorno, G., Sapi, E., Leavitt, J., Kacinski, B., Crystal, R., Schwartz, P., and Deisseroth, A. The use of the L-plastin promoter for adenoviral-mediated, tumor-specific gene expression in ovarian and bladder cancer cell lines. *Cancer Res*, 61: 4405-4413, 2001.
186. Friedman, E. L., Hayes, D. F., and Kufe, D. W. Reactivity of monoclonal antibody DF3 with a high molecular weight antigen expressed in human ovarian carcinomas. *Cancer Res*, 46: 5189-5194, 1986.
187. Tai, Y. T., Strobel, T., Kufe, D., and Cannistra, S. A. In vivo cytotoxicity of ovarian cancer cells through tumor-selective expression of the BAX gene. *Cancer Res*, 59: 2121-2126, 1999.
188. Abe, T., Tominaga, Y., Kikuchi, T., Watanabe, A., Satoh, K., Watanabe, Y., and Nukiwa, T. Bacterial pneumonia causes augmented expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in the murine lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 156: 1235-1240, 1997.
189. Barker S.D., K. A., Rivera A., Coolidge C., Yamamoto M., Hakkarainen T., Alvarez R.D., Curiel D.T., and Hemminki A. The regulatory sequences of the secretory leukoprotease inhibitor gene as a promising tissue-specific promoter for ovarian cancer gene therapy. *Mol Ther*, 5: S412, 2002.
190. Siders, W. M., Halloran, P. J., and Fenton, R. G. Transcriptional targeting of recombinant adenoviruses to human and murine melanoma cells. *Cancer Res*, 56: 5638-5646, 1996.
191. Ring, C. J., Harris, J. D., Hurst, H. C., and Lemoine, N. R. Suicide gene expression induced in tumour cells transduced with recombinant adenoviral,

- retroviral and plasmid vectors containing the ERBB2 promoter. *Gene Ther*, 3: 1094-1103, 1996.
192. Strayer, M. S., Guttentag, S. H., and Ballard, P. L. Targeting type II and Clara cells for adenovirus-mediated gene transfer using the surfactant protein B promoter. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 18: 1-11, 1998.
 193. Lee, E. J., Martinson, F., Kotlar, T., Thimmapaya, B., and Jameson, J. L. Adenovirus-mediated targeted expression of toxic genes to adrenocorticotropin-producing pituitary tumors using the proopiomelanocortin promoter. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 3400-3409, 2001.
 194. Nettelbeck, D. M., Jerome, V., and Muller, R. Gene therapy: designer promoters for tumour targeting. *Trends Genet*, 16: 174-181, 2000.
 195. Walton, T., Wang, J. L., Ribas, A., Barsky, S. H., Economou, J., and Nguyen, M. Endothelium-specific expression of an E-selectin promoter recombinant adenoviral vector. *Anticancer Res*, 18: 1357-1360, 1998.
 196. Varda-Bloom, N., Shaish, A., Gonen, A., Levanon, K., Greenbereger, S., Ferber, S., Levkovitz, H., Castel, D., Goldberg, I., Afek, A., Kopolovitch, Y., and Harats, D. Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. *Gene Ther*, 8: 819-827, 2001.
 197. Katabi, M. M., Chan, H. L., Karp, S. E., and Batist, G. Hexokinase type II: a novel tumor-specific promoter for gene-targeted therapy differentially expressed and regulated in human cancer cells. *Human Gene Therapy*, 10: 155-164, 1999.
 198. Manome, Y., Kunieda, T., Wen, P. Y., Koga, T., Kufe, D. W., and Ohno, T. Transgene expression in malignant glioma using a replication-defective adenoviral vector containing the Egr-1 promoter: activation by ionizing radiation or uptake of radioactive iododeoxyuridine. *Hum Gene Ther*, 9: 1409-1417, 1998.
 199. Rein, D. T., Breidenbach, M., Bauerschmitz, G.J., Herrmann, I., Bender, H.G., Dall, P. Steuerung einer Krebsgentherapie über strahleninduzierbare Promotoren. Ein neuer Ansatz zur kombinierten Radiochemo- und Gentherapie des Zervixkarzinoms [Radiation-induced Promoters for Combined Radiochemo and Gene Therapie of Zervical Carcinoma]. *In: Abstraktband der 204. Tagung der NWGGG 2005, Düsseldorf/Germany 2005.*

200. Hemminki, A., Zinn, K. R., Liu, B., Chaudhuri, T. R., Desmond, R. A., Rogers, B. E., Barnes, M. N., Alvarez, R. D., and Curiel, D. T. In Vivo Molecular Chemotherapy and Noninvasive Imaging With an Infectivity-Enhanced Adenovirus. *J Natl Cancer Inst*, *94*: 741-749, 2002.
201. U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health. Recombinant DNA Advisory Committee: minutes of meeting, December 13 & 15, 2000. *Hum Gene Ther*, *12*: 1559-1584, 2001.
202. Lieber, A., He, C. Y., Meuse, L., Schowalter, D., Kirillova, I., Winther, B., and Kay, M. A. The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J Virol*, *71*: 8798-8807, 1997.
203. Einfeld, D. A., Schroeder, R., Roelvink, P. W., Lizonova, A., King, C. R., Kovesdi, I., and Wickham, T. J. Reducing the native tropism of adenovirus vectors requires removal of both CAR and integrin interactions. *J Virol*, *75*: 11284-11291, 2001.
204. Bayo-Puxan, N., Cascallo, M., Gros, A., Huch, M., Fillat, C., and Alemany, R. Role of the putative heparan sulfate glycosaminoglycan-binding site of the adenovirus type 5 fiber shaft on liver detargeting and knob-mediated retargeting. *J Gen Virol*, *87*: 2487-2495, 2006.
205. Kangasniemi, L., Kiviluoto, T., Kanerva, A., Raki, M., Ranki, T., Sarkioja, M., Wu, H., Marini, F., Hockerstedt, K., Isoniemi, H., Alfthan, H., Stenman, U. H., Curiel, D. T., and Hemminki, A. Infectivity-enhanced adenoviruses deliver efficacy in clinical samples and orthotopic models of disseminated gastric cancer. *Clin Cancer Res*, *12*: 3137-3144, 2006.
206. Ranki, T., Kanerva, A., Ristimäki, A., Hakkarainen, T., Sarkioja, M., Kangasniemi, L., Raki, M., Laakkonen, P., Goodison, S., and Hemminki, A. A heparan sulfate-targeted conditionally replicative adenovirus, Ad5.pk7-Delta24, for the treatment of advanced breast cancer. *Gene Ther*, 2006.
207. Sarkioja, M., Kanerva, A., Salo, J., Kangasniemi, L., Eriksson, M., Raki, M., Ranki, T., Hakkarainen, T., and Hemminki, A. Noninvasive imaging for evaluation of the systemic delivery of capsid-modified adenoviruses in an orthotopic model of advanced lung cancer. *Cancer*, *107*: 1578-1588, 2006.
208. Rancourt, C., Rogers, B. E., Sosnowski, B. A., Wang, M., Piche, A., Pierce, G. F., Alvarez, R. D., Siegal, G. P., Douglas, J. T., and Curiel, D. T. Basic

- fibroblast growth factor enhancement of adenovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene results in augmented therapeutic benefit in a murine model of ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 4: 2455-2461, 1998.
209. Gu, D. L., Gonzalez, A. M., Printz, M. A., Doukas, J., Ying, W., D'Andrea, M., Hoganson, D. K., Curiel, D. T., Douglas, J. T., Sosnowski, B. A., Baird, A., Aukerman, S. L., and Pierce, G. F. Fibroblast growth factor 2 retargeted adenovirus has redirected cellular tropism: evidence for reduced toxicity and enhanced antitumor activity in mice. *Cancer Res*, 59: 2608-2614, 1999.
210. Kashentseva, E. A., Seki, T., Curiel, D. T., and Dmitriev, I. P. Adenovirus targeting to c-erbB-2 oncoprotein by single-chain antibody fused to trimeric form of adenovirus receptor ectodomain. *Cancer Res*, 62: 609-616, 2002.
211. Glasgow, J. N., Bauerschmitz, G. J., Curiel, D. T., and Hemminki, A. Transductional and transcriptional targeting of adenovirus for clinical applications. *Curr Gene Ther*, 4: 1-14, 2004.
212. Curiel, D. T. The development of conditionally replicative adenoviruses for cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 6: 3395-3399, 2000.
213. Curiel, D. T. Rational design of viral vectors based on rigorous analysis of capsid structures [comment]. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 1: 3-4, 2000.
214. Gomez-Navarro, J. and Curiel, D. T. Conditionally replicative adenoviral vectors for cancer gene therapy. *Lancet Oncol*, 1: 148-158, 2000.
215. Takayama, K., Reynolds, P. N., Adachi, Y., Kaliberova, L., Uchino, J., Nakanishi, Y., and Curiel, D. T. Vascular endothelial growth factor promoter-based conditionally replicative adenoviruses for pan-carcinoma application. *Cancer Gene Ther*, 2006.
216. Zhu, Z. B., Chen, Y., Makhija, S. K., Lu, B., Wang, M., Rivera, A. A., Yamamoto, M., Wang, S., Siegal, G. P., Curiel, D. T., and McDonald, J. M. Survivin promoter-based conditionally replicative adenoviruses target cholangiocarcinoma. *Int J Oncol*, 29: 1319-1329, 2006.
217. Rodriguez, R., Schuur, E. R., Lim, H. Y., Henderson, G. A., Simons, J. W., and Henderson, D. R. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res*, 57: 2559-2563, 1997.

218. Yu, D. C., Sakamoto, G. T., and Henderson, D. R. Identification of the transcriptional regulatory sequences of human kallikrein 2 and their use in the construction of calydon virus 764, an attenuated replication competent adenovirus for prostate cancer therapy. *Cancer Research*, *59*: 1498-1504, 1999.
219. Hallenbeck, P. L., Chang, Y. N., Hay, C., Golightly, D., Stewart, D., Lin, J., Phipps, S., and Chiang, Y. L. A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther*, *10*: 1721-1733, 1999.
220. Kurihara, T., Brough, D. E., Kovesdi, I., and Kufe, D. W. Selectivity of a replication-competent adenovirus for human breast carcinoma cells expressing the MUC1 antigen. *J Clin Invest*, *106*: 763-771, 2000.
221. Hernandez-Alcoceba, R., Pihalja, M., Wicha, M. S., and Clarke, M. F. A novel, conditionally replicative adenovirus for the treatment of breast cancer that allows controlled replication of E1a-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*, *11*: 2009-2024, 2000.
222. Adachi, Y., Reynolds, P. N., Yamamoto, M., Wang, M., Takayama, K., Matsubara, S., Muramatsu, T., and Curiel, D. T. A midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for treatment of pediatric solid tumors and bone marrow tumor purging. *Cancer Res*, *61*: 7882-7888, 2001.
223. Freytag, S. O., Rogulski, K. R., Paielli, D. L., Gilbert, J. D., and Kim, J. H. A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy. *Human Gene Therapy*, *9*: 1323-1333, 1998.
224. Wildner, O., Morris, J. C., Vahanian, N. N., Ford, H., Jr., Ramsey, W. J., and Blaese, R. M. Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer. *Gene Ther*, *6*: 57-62, 1999.
225. McCormick, F. Cancer-specific viruses and the development of ONYX-015. *Cancer Biol Ther*, *2*: S157-160, 2003.
226. Cohen, E. E. and Rudin, C. M. ONYX-015. Onyx Pharmaceuticals. *Curr Opin Investig Drugs*, *2*: 1770-1775, 2001.
227. Macrae, M., Neve, R. M., Rodriguez-Viciano, P., Haqq, C., Yeh, J., Chen, C., Gray, J. W., and McCormick, F. A conditional feedback loop regulates Ras activity through EphA2. *Cancer Cell*, *8*: 111-118, 2005.

228. Wadler, S., Yu, B., Tan, J. Y., Kaleya, R., Rozenblit, A., Makower, D., Edelman, M., Lane, M., Hyjek, E., and Horwitz, M. Persistent replication of the modified chimeric adenovirus ONYX-015 in both tumor and stromal cells from a patient with gall bladder carcinoma implants. *Clin Cancer Res*, 9: 33-43, 2003.
229. Edwards, S. J., Dix, B. R., Myers, C. J., Dobson-Le, D., Huschtscha, L., Hibma, M., Royds, J., and Braithwaite, A. W. Evidence that replication of the antitumor adenovirus ONYX-015 is not controlled by the p53 and p14(ARF) tumor suppressor genes. *J Virol*, 76: 12483-12490, 2002.
230. Rothmann, T., Hengstermann, A., Whitaker, N. J., Scheffner, M., and zur Hausen, H. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *Journal of Virology*, 72: 9470-9478, 1998.
231. Hay, J. G., Shapiro, N., Sauthoff, H., Heitner, S., Phupakdi, W., and Rom, W. N. Targeting the replication of adenoviral gene therapy vectors to lung cancer cells: the importance of the adenoviral E1b-55kD gene. *Hum Gene Ther*, 10: 579-590, 1999.
232. Dix, B. R., Edwards, S. J., and Braithwaite, A. W. Does the Antitumor Adenovirus ONYX-015/dl1520 Selectively Target Cells Defective in the p53 Pathway? *J Virol*, 75: 5443-5447., 2001.
233. Barker, D. D. and Berk, A. J. Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection [published erratum appears in *Virology* 1987 May;158(1):263]. *Virology*, 156: 107-121, 1987.
234. Cherubini, G., Petouchoff, T., Grossi, M., Piersanti, S., Cundari, E., and Saggio, I. E1B55K-Deleted Adenovirus (ONYX-015) Overrides G(1)/S and G(2)/M Checkpoints and Causes Mitotic Catastrophe and Endoreduplication in p53-Proficient Normal Cells. *Cell Cycle*, 5, 2006.
235. Wadler S, Y. B., Lane M, Kaleya R, Makower D, and Horwitz M In situ reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay to assess the viability of ONYX-015 adenovirus in abdominal wall gall bladder carcinoma implants. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 43: 1097, 2002.
236. Sherr, C. J. Cancer cell cycles. *Science*, 274: 1672-1677., 1996.

237. Doronin, K., Kuppuswamy, M., Toth, K., Tollefson, A. E., Krajcsi, P., Krougliak, V., and Wold, W. S. Tissue-specific, tumor-selective, replication-competent adenovirus vector for cancer gene therapy. *J Virol*, *75*: 3314-3324, 2001.
238. Shinoura, N., Yoshida, Y., Tsunoda, R., Ohashi, M., Zhang, W., Asai, A., Kirino, T., and Hamada, H. Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant E1B-defective adenovirus for gene therapy of gliomas. *Cancer Res*, *59*: 3411-3416, 1999.
239. Lamfers, M. L., Grill, J., Dirven, C. M., Van Beusechem, V. W., Geoerger, B., Van Den Berg, J., Alemany, R., Fueyo, J., Curiel, D. T., Vassal, G., Pinedo, H. M., Vandertop, W. P., and Gerritsen, W. R. Potential of the conditionally replicative adenovirus Ad5-Delta24RGD in the treatment of malignant gliomas and its enhanced effect with radiotherapy. *Cancer Res*, *62*: 5736-5742, 2002.
240. Kanerva, A. and Hemminki, A. Adenoviruses for treatment of cancer. *Ann Med*, *37*: 33-43, 2005.
241. Breidenbach, M., Rein, D. T., Wang, M., Nettelbeck, D. M., Hemminki, A., Ulasov, I., Rivera, A. R., Everts, M., Alvarez, R. D., Douglas, J. T., and Curiel, D. T. Genetic replacement of the adenovirus shaft fiber reduces liver tropism in ovarian cancer gene therapy. *Hum Gene Ther*, *15*: 509-518, 2004.
242. Stecher, H., Shayakhmetov, D. M., Stamatoyannopoulos, G., and Lieber, A. A capsid-modified adenovirus vector devoid of all viral genes: assessment of transduction and toxicity in human hematopoietic cells. *Mol Ther*, *4*: 36-44, 2001.
243. Yu, L., Takenobu, H., Shimosato, O., Kawamura, K., Nimura, Y., Seki, N., Uzawa, K., Tanzawa, H., Shimada, H., Ochiai, T., and Tagawa, M. Increased infectivity of adenovirus type 5 bearing type 11 or type 35 fibers to human esophageal and oral carcinoma cells. *Oncol Rep*, *14*: 831-835, 2005.
244. Ni S, G. A., Di Paolo N, Li ZY, Liu Y, Strauss R, Sova P, Morihara J, Feng O, Kiviat N, Toure P, Sow PS, Lieber A Evaluation of adenovirus vectors containing serotype 35 fibers for tumor targeting. *Cancer Gene Ther*, *13*: 1072-1081, 2006.
245. DiPaolo, N., Ni, S., Gaggar, A., Strauss, R., Tuve, S., Li, Z. Y., Stone, D., Shayakhmetov, D., Kiviat, N., Toure, P., Sow, S., Horvat, B., and Lieber, A. Evaluation of adenovirus vectors containing serotype 35 fibers for vaccination. *Mol Ther*, *13*: 756-765, 2006.

246. Stone, D. and Lieber, A. New serotypes of adenoviral vectors. *Curr Opin Mol Ther*, 8: 423-431, 2006.
247. Toth, K., Spencer, J. F., Tollefson, A. E., Kuppaswamy, M., Doronin, K., Lichtenstein, D. L., La Regina, M. C., Prince, G. A., and Wold, W. S. Cotton rat tumor model for the evaluation of oncolytic adenoviruses. *Hum Gene Ther*, 16: 139-146, 2005.
248. Smith, R. R., Huebner, R. J., Rowe, W. P., Schatten, W. E., and Thomas, L. B. Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer*, 9: 1211-1218, 1956.
249. Ganly, I., Eckhardt, S. G., Rodriguez, G. I., Soutar, D. S., Otto, R., Robertson, A. G., Park, O., Gulley, M. L., Heise, C., Von Hoff, D. D., and Kaye, S. B. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer [published erratum appears in *Clin Cancer Res* 2000 May;6(5):2120]. *Clin Cancer Res*, 6: 798-806, 2000.
250. Nemunaitis, J., Ganly, I., Khuri, F., Arseneau, J., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., Maples, P., Romel, L., Randlev, B., Reid, T., Kaye, S., and Kirn, D. 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 Res*, 60: 6359-6366, 2000.
251. Xia, Z. J., Chang, J. H., Zhang, L., Jiang, W. Q., Guan, Z. Z., Liu, J. W., Zhang, Y., Hu, X. H., Wu, G. H., Wang, H. Q., Chen, Z. C., Chen, J. C., Zhou, Q. H., Lu, J. W., Fan, Q. X., Huang, J. J., and Zheng, X. [Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus.]. *Ai Zheng*, 23: 1666-1670, 2004.
252. Yu, W. and Fang, H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Curr Cancer Drug Targets*, 7: 141-148, 2007.
253. DeWeese, T., Drew, R., Li, S., Goemann, M., Mikhak, B., and al., e. Final Results of a Phase I Study of CV706, a Conditionally Replication-Competent Cytolytic Adenovirus, for the Treatment of Locally-Recurrent Prostate Cancer. *Mol Ther*, 3: S310, 2001.
254. Casado, E., Alemany, R., Suzuki, K., Gomez Navarro, J., Arafat, W., Barker, S., De Castro, J., Feliu, J., Zamora, P., Lopez, J., Gonzalez Baron, M., and

- Curiel, D.T. A Conditionally Replicative Adenovirus with Enhanced Infectivity (Ad D24-RGD) for Ovarian Cancer Gene Therapy: Preclinical Evaluation of Selectivity, Oncolytic Potency and Chemotherapy Combination Strategies. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, 20: 253a, 2001.
255. van Beusechem, V. W., Mastenbroek, D. C., van den Doel, P. B., Lamfers, M. L., Grill, J., Wurdinger, T., Haisma, H. J., Pinedo, H. M., and Gerritsen, W. R. Conditionally replicative adenovirus expressing a targeting adapter molecule exhibits enhanced oncolytic potency on CAR-deficient tumors. *Gene Ther*, 10: 1982-1991, 2003.
256. Rein, D. T., Breidenbach, M., Kirby, T. O., Han, T., Siegal, G. P., Bauerschmitz, G. J., Wang, M., Nettelbeck, D. M., Tsuruta, Y., Yamamoto, M., Dall, P., Hemminki, A., and Curiel, D. T. A fiber-modified, secretory leukoprotease inhibitor promoter-based conditionally replicating adenovirus for treatment of ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 11: 1327-1335, 2005.
257. Raper, S. E., Yudkoff, M., Chirmule, N., Gao, G. P., Nunes, F., Haskal, Z. J., Furth, E. E., Propert, K. J., Robinson, M. B., Magosin, S., Simoes, H., Speicher, L., Hughes, J., Tazelaar, J., Wivel, N. A., Wilson, J. M., and Batshaw, M. L. A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Gene Ther*, 13: 163-175, 2002.
258. Isner, J. M. and Asahara, T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 103: 1231-1236, 1999.
259. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L., and Fischer, A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288: 669-672, 2000.
260. Kay, M. A., Manno, C. S., Ragni, M. V., Larson, P. J., Couto, L. B., McClelland, A., Glader, B., Chew, A. J., Tai, S. J., Herzog, R. W., Arruda, V., Johnson, F., Scallan, C., Skarsgard, E., Flake, A. W., and High, K. A. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet*, 24: 257-261, 2000.
261. Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J. P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S.,

- Fischer, A., Davies, E. G., Kuis, W., Leiva, L., and Cavazzana-Calvo, M. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med*, 346: 1185-1193, 2002.
262. Mulvihill, S., Warren, R., Venook, A., Adler, A., Randlev, B., Heise, C., and Kirn, D. Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primary carcinomas of the pancreas: a phase I trial. *Gene Therapy*, 8: 308-315, 2001.
263. Nemunaitis, J., Cunningham, C., Buchanan, A., Blackburn, A., Edelman, G., Maples, P., Netto, G., Tong, A., Randlev, B., Olson, S., and Kirn, D. Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity. *Gene Ther*, 8: 746-759, 2001.
264. Kirn, D. Clinical research results with dl1520 (Onyx-015), a replication selective adenovirus for the treatment of cancer: what have we learned ? *Gene Therapy*, 8: 89-98, 2001.
265. Vasey, P. A., Shulman, L. N., Campos, S., Davis, J., Gore, M., Johnston, S., Kirn, D. H., O'Neill, V., Siddiqui, N., Seiden, M. V., and Kaye, S. B. Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 20: 1562-1569, 2002.
266. Khil, M., Aguilar-Cordova, E., Ho, K. J., Freytag, S., Stricker, H., and al., e. Phase I Study of Replication-Competent Adenovirus-Mediated Double Suicide Gene Therapy for Local Recurrence of Prostate Cancer After Definitive Radiation Therapy. *Mol Ther*, 3: S310, 2001.
267. Reid, T. R., Galanis, E., Abbruzzese, J., Sze, D., Andrews, J., Randlev, B., Rubin, J., and Kirn, D. Intra-arterial Administration of a Replication-Selective Adenovirus Ci-1042 (Onyx-015) in Patients with Colorectal Carcioma Metastatic to the Liver: Safety, Feasibility and Biological Activity. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 20: A549, 2001.
268. Habib, N. A., Sarraf, C. E., Mitry, R. R., Havlik, R., Nicholls, J., Kelly, M., Vernon, C. C., Gueret-Wardle, D., El-Masry, R., Salama, H., Ahmed, R., Michail, N., Edward, E., and Jensen, S. L. E1B-Deleted Adenovirus (dl1520)

- Gene Therapy for Patients with Primary and Secondary Liver Tumors. *Hum Gene Ther*, 12: 219-226., 2001.
269. 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. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J Clin Oncol*, 19: 289-298., 2001.
270. Hecht, J. R., Bedford, R., Abbruzzese, J. L., Lahoti, S., Reid, T. R., Soetikno, R. M., Kirn, D. H., and Freeman, S. M. A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res*, 9: 555-561, 2003.
271. Hamid, O., Varterasian, M. L., Wadler, S., Hecht, J. R., Benson, A., 3rd, Galanis, E., Uprichard, M., Omer, C., Bycott, P., Hackman, R. C., and Shields, A. F. Phase II trial of intravenous CI-1042 in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 21: 1498-1504, 2003.
272. DeWeese, T., Arterbery, E., Michalski, J., Sylvester, J., Terris, M., Wilding, G., Yu, D., Moore, L., Kimball, L., Ando, D., and Kirn, D. A Phase I/II Dose Escalation Trial of the Intra Prostatic Injection of CG7870, a Prostate Specific Antigen-Dependent Oncolytic Adenovirus in Patients with Locally Recurrent Prostate Cancer Following Definitive Radiotherapy. *Mol Ther*, 7: S446, 2003.
273. Small, E. J., Carducci, M. A., Burke, J. M., Rodriguez, R., Fong, L., van Ummersen, L., Yu, D. C., Aimi, J., Ando, D., Working, P., Kirn, D., and Wilding, G. A phase I trial of intravenous CG7870, a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate cancer. *Mol Ther*, 14: 107-117, 2006.
274. <http://www.wiley.com/genetherapy/clinical/> The Journal of Gene Medicine Clinical Trial site.
275. <http://www4.od.nih.gov/oba/rac/clinicaltrial.htm> Clinical trials in Human Gene Transfer. NIH OBA Human Gene Transfer Clinical Trials Database -- Phase I.