

종양 표적 유전자 치료

원자력의학원 핵의학연구소
강 주 현

Tumor targeted gene therapy

Joo Hyun Kang, Ph.D.

Laboratory of Nuclear Medicine, Korea Institute of Radiological and Medical Science, Seoul, Korea

Knowledge of molecular mechanisms governing malignant transformation brings new opportunities for therapeutic intervention against cancer using novel approaches. One of them is gene therapy based on the transfer of genetic material to an organism with the aim of correcting a disease. The application of gene therapy to the cancer treatment has led to the development of new experimental approaches such as suicidal gene therapy, inhibition of oncogenes and restoration of tumor-suppressor genes. Suicidal gene therapy is based on the expression in tumor cells of a gene encoding an enzyme that converts a prodrug into a toxic product. Representative suicidal genes are Herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk) and cytosine deaminase (CD). Especially, physicians and scientists of nuclear medicine field take an interest in suicidal gene therapy because they can monitor the location and magnitude, and duration of expression of HSV1-tk and CD by PET scanner. (Nucl Med Mol Imaging 2006;40(5):237-242)

Key Words: gene therapy, PET imaging, prodrug therapy, suicidal gene therapy, tumor targeting

서 론

최근 세포 및 분자 생물학의 폭발적인 발전으로 많은 종류의 질병들에 대한 원인이 유전자의 변이 또는 발현이 정상적으로 조절되지 않는 등 유전자 변화에 의해 초래되고 있음이 밝혀지고 있다. 인체는 정상적인 유전자에 의해 생산된 단백질이 올바른 기능을 수행함으로써 항상성을 유지할 수 있다. 따라서 질병의 증상을 경감시키는 방법을 사용하기 보다는 이상 유전자를 정상 유전자로 교체함으로써 질병의 원인을 근본적으로 제거해줄 수 있는 방법으로 유전자 치료가 시작되었다. 처음으로 시도된 유전자 치료는 1990년 미국에서 선천성 면역결핍 환자를 대상으로 정상 adenosine deaminase 유전자를 발현하여 치료를 유도한 경우였다.¹⁾

그 후 유전자 치료의 적용 범위가 넓어져서 다양한 질환에 유전자 치료가 시도되고 있고 대상 질환은 종양이 가장

대표적이며 그 외에도 선천성 면역결핍증이나 선천성 대사장애 등이 있다. 그리고 유전자 치료의 접근 방법도 다양해져서 이상 유전자를 정상 유전자로 교정하는 방법 뿐만 아니라 새로운 기능을 부여하는 유전자를 발현시켜 치료하려는 시도들이 있다. 특히 종양의 경우에는 종양 세포만을 죽이기 위해서 원래 인체에 발현되지 않는 자살 유전자를 전달하여 발현시킴으로써 자살 유전자 치료 (suicidal gene therapy)가 시행되고 있다.²⁾ 대표적인 자살 유전자로는 Herpes Simplex Virus type I thymidine kinase (HSV1-tk)와 cytosine deaminase (CD) 등이 있다.^{3,4)} 특히 핵의학 분야에서 이들 자살 유전자에 주목하는 이유는 유전자치료를 임상에 적용하였을 경우, 이 유전자에 의해 발현되는 효소에 특이한 기질을 적당한 PET tracer로 표지하여 생체에 투여하게 되면 치료유전자의 발현 정도, 발현 위치 및 발현 지속 기간을 PET 영상을 통해서 모니터링 할 수 있기 때문이다.⁵⁻⁸⁾ 따라서 이들 유전자는 종양의 치료용 유전자일 뿐만 아니라 PET 리포터 유전자로 많이 응용되고 있으며, 앞으로 효용성이 더욱 확대될 것으로 예상된다.

1. 자살 유전자 치료 (suicidal gene therapy)

종양세포에 HSV1-tk 또는 CD 유전자의 발현을 유도한 후, 독성이 없는 전구체 (prodrug)를 투여하면 이들 유전자가

• Received: 2006. 10. 9. • Accepted: 2006. 10. 18.
• Address for reprints: Joo Hyun Kang Ph.D., Laboratory of Nuclear Medicine, Korea Institute of Radiological and Medical Science, 215-4 Gongneung-dong, Nowon-gu, Seoul 139-706, Korea
Tel: 82-2-970-1339, Fax: 82-2-970-1341
E-mail: kang2325@kcch.re.kr
※ 이 연구는 원자력연구개발사업 (방사성의약품 이용치료 및 영상 연구)의 지원을 일부 받았음.

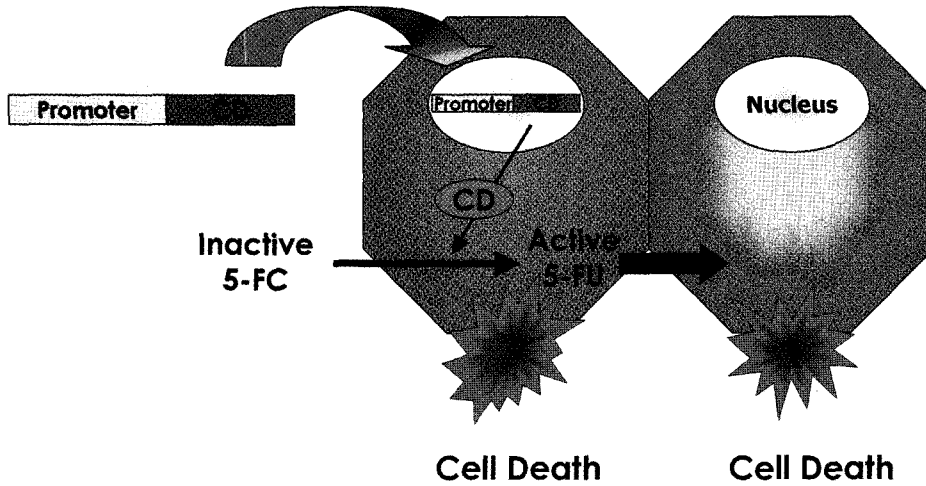


Fig. 1. Bystander effect. Gap junctions are important in mediating the bystander effect which is most evident in tumour cells.

발현된 종양세포에서만 전구체가 독성물질로 전환되어 유전자가 발현된 세포만 사멸하게 한다. 즉, 전구체를 생체에 투여했을 때 정상세포에는 독성이 나타나지 않지만 치료유전자가 발현되는 종양세포에만 전구체가 독성물질로 전환되어 종양세포를 파괴시키는 방법이다. 또한 전환된 독성물질은 세포와 세포를 연결해주는 gap junction을 통해 주변의 다른 종양세포에도 전달되어 치료효과가 나타나는 bystander effect도 기대할 수 있다(Fig. 1)⁹⁾. 현재까지 HSV1-tk를 이용한 종양의 치료유전자 발현 연구가 임상에도 적용되고 있으며, 특히 최근에 치료과정을 PET으로 모니터링한 연구결과들이 속속 발표되고 있다.^{5,10)} 그에 비해서 CD유전자를 이용한 연구는 상대적으로 덜 진행되어 있으나¹¹⁾ 종양세포에 따라 HSV1-tk 또는 CD에 의한 치료효과가 다를 수 있고 바이러스 유래가 아닌 유전자를 사용한다는 점에서 앞으로의 연구가 주목받고 있다.

2. HSV1-tk/ganciclovir (HSV1-tk/GCV)

Thymidine kinase는 deoxythymidine을 인산화시키는 반응을 촉매한다. 인산화된 deoxythymidine은 세포내 다른 kinase에 의한 반응을 거쳐 삼인산화 deoxythymidine으로 전환되어 DNA 합성에 참여하게 된다. HSV1-tk의 경우에는 그의 기질특이성이 넓어서 thymidine 뿐만 아니라 퓨린 계열의 뉴클레오티드인 acyclovir (9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine) 및 ganciclovir (9-((2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl)guanine)와 penciclovir (9-(4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)but-1-yl)guanine)도 인산화시킨다. 인산화된 GCV는 세포내 다른 kinase에 의해 삼인산화

되고 DNA 합성에 사용되는데 삼인산화된 GCV는 DNA 단일가닥을 깨뜨리거나 DNA polymerase의 활성을 강력히 억제하게 된다. 따라서 HSV감염에 GCV가 치료제로 쓰이게 되었다. HSV1-tk/GCV에 의한 치료법은 활발하게 세포가 분열중인 단계에 특히 효과가 좋다고 알려져 있고¹²⁾ hypoxic 상태의 세포를 포함하는 종양부위에는 효과가 떨어지는 단점이 있다.

HSV1-tk/GCV 치료법은 *in vitro* 뿐만 아니라 여러 종양 동물 모델에서 검증되었으며 그의 효과는 활성 측정 방법 또는 종양 세포의 종류에 따라 다양하였다. 쥐의 뇌종양 동물 모델에서 뇌종양세포의 10% 만이 HSV1-tk 유전자가 발현되었어도 GCV 투여 후 tk유전자가 도입되지 않은 주변의 암세포까지 살상하는 bystander effect도 기대할 수 있었다.¹³⁾ HSV1-tk/GCV 치료는 임상에서는 주로 뇌종양환자^{10,13,14)}에게 적용하고 있으며 흑색종¹⁵⁾, 전립선암¹⁶⁾, 난소암^{17,18)} 등에 임상 1상 시행중이다. HSV1-tk에 특이한 기질을 적당한 positron emitter로 표지한 약제를 이용하여 HSV1-tk 유전자 치료과정을 PET영상으로 모니터링하는 연구가 진행되고 있다. Jacob등¹⁰⁾이 뇌종양환자에 tk유전자 치료과정을 I-124가 표지된 FIAU로 PET 모니터링한 보고가 있으며, Penuelas등⁵⁾이 간암환자에게 tk유전자를 아데노바이러스를 이용하여 전달한 후의 유전자의 발현 정도와 위치 등을 F-18이 표지된 FHBG로 모니터링하였다.

3. Cytosine deaminase/5-fluorocytosine (CD/5-FC)

5-Fluorouracil (5-FU)은 특히 대장암에 효과가 좋으며, 널리 사용되는 항암제이다. 하지만 부작용이 심하고 치료반

응을 유도하기 위해서는 다량의 용량을 투여해야하는 단점들 때문에 사용에 제한이 되고 있다. Cytosine deaminase (CD)는 주로 대장균이나 효모에서 발견되는 효소이며, 독성이 적은 5-fluorocytosine (5-FC)를 5-FU로 전환하는 반응을 촉매한다. 5-FU는 세포내 효소에 의해 삼인산화 5-fluorouridine로 전환되어 DNA 합성에 참여하며, mRNA의 processing과정을 방해하고 thymidylate synthase의 활성을 억제하여 세포 살상효과를 나타낸다. CD/5-FC의 bystander effect는 HSV1-tk/GCV와는 달리 gap junction에 의해 일어나지 않는다. 즉, 5-FU는 non-facilitated diffusion으로 세포 내외로 이동할 수 있다.

In vitro 연구결과를 보면 CD/5-FC에 의한 치료효과는 중앙세포의 종류에 따라 세포의 생존율을 50%로 하는 5-FC의 농도가 0.2에서 600μM로 매우 다양하였다. 간암세포의 20%만 CD 유전자가 이입된 경우 5-FC 처리한 후 75%의 중앙세포를 죽일 수 있었으며, 이와 같은 치료효과성적은 HSV1-tk/GCV의 경우와 비슷한 수준이었다.¹⁹⁾ 하지만 대장암모델에서는 4%만의 중앙세포가 CD유전자를 발현해도 5-FC 처리 후 60%의 치료효과를 나타냈으며, HSV1-tk/GCV치료법으로 같은 정도의 치료효과를 기대하기 위해서는 HSV1-tk유전자 이입세포의 수가 적어도 전체 중앙 세포중의 50%는 되어야한다고 보고하였다.²⁰⁾

유전자치료를 시행할 때 일반적으로 유전자 치료만을 단독으로 시행하지 않고 다른 치료법과 함께 병행한다. 특히 유전자치료와 방사선치료를 병행할 때 CD/5-FC 치료법이 유리하다. 왜냐하면 5-FC가 방사선치료증진 효과가 있음이 알려져 있으며, 대장암 모델에서 CD/5-FC 유전자 치료와 방사선치료를 병행하였을 때 중앙의 치료효과가 향상되었음이 보고되었다.²¹⁾ CD/5-FC치료법이 임상에 접근하는 방법은 HSV1-tk유전자와 CD유전자를 융합하여 발현시켜 두 가지 치료법을 병행하려는 시도가 있으며, 주로 전립선암과 대장암에서 시행하고 있다.^{22,23)}

Abody 등은 신경줄기세포에 CD유전자를 발현시킨 후 쥐 뇌중앙모델에 투입한 결과 신경줄기세포가 중앙부위로 이동하였으며 줄기세포에서 발현되는 CD에 의해 5-FC가 5-FU로 전환되어 뇌중앙치료효과가 있음을 보고한 바 있다.²⁴⁾ 이와 같은 연구결과는 중앙에 치료유전자를 효과적으로 표적화시키지 못할 경우 줄기세포를 치료유전자 전달방법으로 채택할 수 있는 가능성이 열렸다. 그리고 *Salmonella*와 같은 세균이 중앙부위로 이동하는 성질을 이용하여 CD 유전자를 발현하는 균주를 제조하여 CD/5-FC 치료효과를 중앙부위로 유도한 연구결과도 발표되었다.^{25,26)} CD를 핵의학 영상 리포터로 이용하려는 시도로 Haberkorn 등이 CD유전자가 발

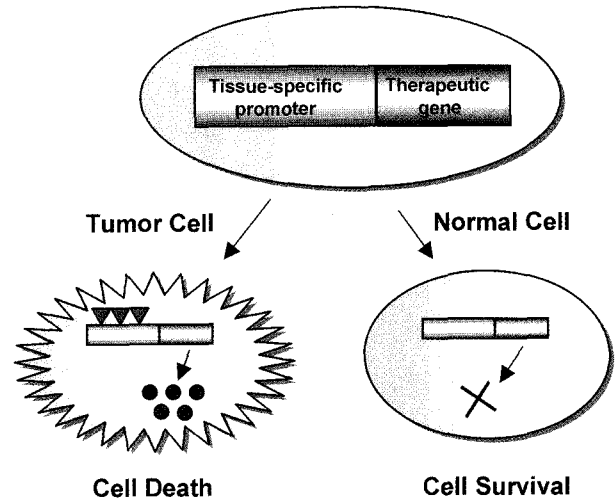


Fig. 2. Schematic representation of transcriptionally targeted gene expression. Tissue-specific promoter-driven therapeutic gene is transferred into both targeted tumor cells and non-targeted normal cells. However, transgene expression can only occur in tumor cells due to the presence of transcription factors competent to mediate expression of the specific promoter. The triangles and circles denote the endogenous gene product expressed from the specific promoter and therapeutic gene product, respectively.

현되는 아교모종세포에서 H-3로 표지된 5-FC이 5-FU로 전환된 연구결과를 발표한 바 있다.²⁷⁾ CD 유전자를 분자영상용 리포터 유전자로 응용하기 위해서는 cytosine 염기 구조를 변형시킨 다양한 화합물의 개발이 시급하다. 그리고 대장균 뿐만 아니라 효모에서 유래한 CD 유전자도 있으므로 다른 종류의 CD 효소의 특성 분석을 통한 적절한 분자영상용 CD 유전자의 개발이 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

4. 중앙 표적 유전자 치료

유전자 치료법을 이용한 중앙치료가 성공적으로 수행되기 위해서는 치료 유전자의 발현이 중앙세포에만 특이적으로 발현되도록 고안되어야 한다. 즉, 치료 유전자의 발현이 중앙세포에만 국한됨으로써 주변의 정상세포에는 세포독성의 영향이 미치지 않도록 해야 한다. 치료 유전자의 발현이 중앙세포에만 제한적으로 발현되도록 함으로써 중앙의 치료효율을 증가시킬 뿐만 아니라 안전성도 도모할 수 있을 것으로 기대하고 있으며, 이와 같은 목적을 달성하기 위해 여러 연구들이 진행되고 있는데 크게 3가지의 접근 방법으로 나눌 수 있다.

첫번째는 전사조절에 의한 표적화 (transcriptional targeting)인데 이 방법은 중앙세포에서 특이적으로 많이 발현되고 있는 유전자의 프로모터/인핸서를 이용하여 치료유전자의 발현을 조절하도록 유도하는 방법이다(Fig. 2). 대표적인

Table 1. Tissue- and cancer-specific promoters used in targeted gene therapy

Promoter	Target tumor type	Summary
GFAP	Glioma	Ad with GFAP or NSE promoter driving FasL exhibited diminished liver toxicity
Tyrosinase	Melanoma	Tissue-specific expression combined with E1A mutation exhibited highly selective oncolysis of melanoma
PSA	Prostate cancer	Ad with E1A driven by PSA promoter destroyed LNCaP tumors Ad with chimeric PSA promoter driving luciferase-visualized metastasized prostate cancer lesions
ALA	Breast cancer	Ad with ALA or β -lactoglobulin promoter driving HSV-TK exhibited regression of breast cancer in animal model
CEA	Digestive tract cancer	Cytotoxic gene therapy approach with viral vector using CEA promoter
AFP	Hepatocellular carcinoma	Cytotoxic or immunotherapy for hepatocellular carcinoma with viral vector regulated by AFP promoter
HIF-1 α	Tumor (fibrosarcoma)	Specific expression with hypoxia-responsive element in HT1080 transfectant in vitro and in vivo
hTERT	Tumor (glioma)	Constitutive active caspase-6 driven by hTERT promoter suppressed glioma in nude mice Tumor-selective oncolytic adenovirus
E2F	Tumor	Oncocytic effect of conditional-replicating Ad in Rb pathway-defective cells
Osteocalcin	Prostate cancer	Conditional-replicating Ad co-targeting tumor and associated osteoblasts kills cancer cells in vitro and skeletal metastasis in animal model
Muc-1	Breast cancer	Ad with E1A driven by DF3/MUC1 promoter and CMV promoter driven TNF induced tumor regression
(DF3)	Ovarian cancer	Ad with the BAX driven by DF3 promoter showed cytotoxicity in vitro and in vivo
L-plastin	Breast and ovarian cancer	Conditional-replicating Ad with E1A driven by truncated L-plastin promoter showed cytotoxic effect in animal model

ALA, α -lactalbumin; DF3/Muc-1, mucin core protein-1; E2F, E2A-binding factor; GFAP, glial fibrillary acidic protein; PSA, prostate-specific antigen; CEA, carcinoembryonic antigen; AFP, α -fetoprotein; HIF-1 α , α -subunit of hypoxia-inducible transcription factor-1; hTERT, human telomerase reverse transcriptase
Adapted by Wu L et al. (2003)

로 전립선암에 특이한 프로모터/인핸서로 PSA (Prostate Specific Antigen) 프로모터를 이용한 방법이 있다.^{28,29)} PSA 단백질은 정상 또는 암화된 전립선 상피세포에서만 발현되는 세린계열의 단백질분해효소로 전립선암을 진단하는 serum marker로도 쓰이고 있다. 이와 같은 예는 간암의 α -fetoprotein, melanoma의 tyrosinase, 유방암의 α -lactalbumin 등이 있다(Table 1).³⁰⁾ Yang 등은 전립선암을 표적으로 하여 HSA-tk 유전자의 발현이 PSA 프로모터의 조절을 받도록 한 전립선암(LNCaP)세포를 제조하고 이것을 SCID 쥐에 이식한 후 종양이 자라는 과정을 F-18이 표지된 FHBG로 microPET영상을 획득하였다.³¹⁾

두번째는 종양세포표면에 특이적으로 발현되는 항원 단백질과 상호 작용할 수 있는 단백질을 아데노바이러스의 표면에 발현하도록 하여 종양세포로 표적화함으로써 치료 유전자의 발현이 종양세포에만 제한되도록 하는 방법(transductional targeting)이다 (Fig. 3). 아데노바이러스가 세포에 결합하는 부위 (knob)의 단백질을 EGF (epidermal growth factor)와 융합시켜 발현시킨 바이러스는 EGF

receptor를 과량 발현하는 종양세포에 유전자 전달 및 발현 효능이 우수하였음이 발표되었다.³²⁾

세 번째는 종양세포의 세포내 pathway에 특이적으로 작용하도록 고안된 것으로 대표적인 경우가 oncolytic 아데노바이러스 (CRAd: conditionally replicative adenovirus)가 있다. 유전자 치료 분야에서 유전자를 전달하는 주된 방법으로 채택되고 있는 것이 아데노바이러스이다. 환자 또는 연구자의 안전을 고려해서 자기 증식기능을 잃어버린 복제 불능의 아데노바이러스를 사용한다. 그러나 이 경우 안전은 확보되지만 복제 불능의 아데노바이러스는 일차적으로 감염된 종양세포에만 치료유전자를 전달 할 수 있을 뿐 나머지 종양 세포에는 유전자 전달을 할 수 없다. 이와 같은 단점을 극복하고자 p53단백질에 변이가 생긴 종양세포에서만 선택적으로 증식하여 종양세포를 살상할 수 있는 oncolytic 아데노바이러스가 개발되었다.³³⁾ Oncolytic 아데노바이러스를 투여할 경우 일차적으로 감염된 종양세포 뿐만 아니라 주변의 종양 세포들도 이차적으로 감염됨으로써 그 치료효과가 증폭되어 나타나는 반면에, 정상 세포에는 영향을 주지 않으므로 독성

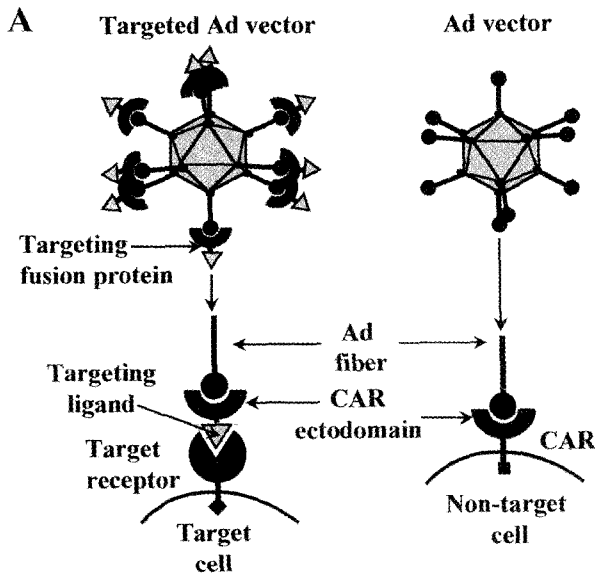


Fig. 3. Transductional Targeting. Ad vectors normally achieve cell binding via interaction between the knob domain of viral fiber protein with CAR (B). To redirect an Ad vector to an alternative cell surface receptor, a genetically engineered targeting fusion protein consisting of the CAR ectodomain fused to a receptor-specific targeting ligand was used. Adapted by Dmitriev I et al. (2000)

이 매우 줄어들게 된다. 예를 들어 luciferase를 발현하는 아데노바이러스 (Ad-Luci)와 oncolytic 아데노바이러스 (CRAd)를 동시에 투여한 결과 luciferase를 발현하는 아데노바이러스만을 투여한 결과에 비하여 luciferase영상이 약 20-60배 정도 증가되었음이 관찰되었고, 따라서 oncolytic 아데노바이러스에 의한 유전자 발현의 증폭효과를 영상으로 확인할 수 있었다(Fig. 4).³⁴⁾ 현재, 치료 유전자의 발현을 종양세포로만 표적하는 치료를 더욱 효율적으로 수행하기 위하여 위에 서술한 표적화 방법을 서로 병행하는 시도들이 이루어지고 있다.

결론

인간 유전체 연구가 성공적으로 완성됨으로써 유전자의 많은 기능들이 속속들이 밝혀지게 되었고, 이에 따라 질병의 유전자 치료 연구가 더욱 각광을 받고 있다. 현재 다양한 유전자 치료법이 임상 단계에 까지 적용되고 있지만 아직까지도 치료유전자 이입 효율성 향상, 이입된 유전자의 적절한 발현 및 기능 유지 및 안정성의 확보 등 해결해야 할 과제들이 많이 남아있다. 핵의학 분야의 다양한 영상 방법을 적용하여 치료 유전자 발현 정도 및 적절한 기능의 유지를 모니터링 할 수 있으므로 자살 유전자치료는 핵의학 분야에서 관심을 갖고 연구를 주도적으로 수행해야 한다.

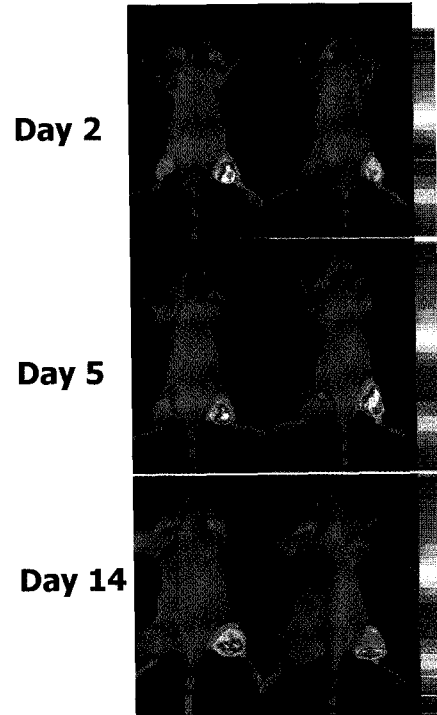


Fig. 4. Bioluminescence tumor imaging showed enhanced long-term luciferase expression by combination treatment of Ad-Luci and CRAd. NCI-H460 (human lung cancer) was injected into four flank sites and treated with PBS (left shoulder), CRAd (right shoulder), Ad-Luci (left thigh) and CRAd plus Ad-Luci (right thigh).

References

1. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: Initial trial results after 4 years. *Science* 1995;270: 475-480.
2. Huber BE, Richards CA, Krenitsky TA. Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: an innovative approach for cancer therapy *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 8039-43.
3. Greco O, Dachs GU. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future prospectives. *J Cell Physiol* 2001;187:22-36.
4. Patterson AV, Saunders MP, Greco O. Prodrugs in genetic chemoradiotherapy. *Curr Pharm Des* 2003;9:2131-54.
5. Penuelas I, Mazzolini G, Boan JF, Sangro B, Marti-Climent J, Ruiz M, et al. Positron emission tomography imaging of adenoviral-mediated transgene expression in liver cancer patients. *Gastroenterology* 2005;128:1787-95.
6. Wang Y, Iyer M, Annala AJ, Chappell S, Mauro V, Gambhir SS. Noninvasive monitoring of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals using improved bicistronic vectors. *J Nucl Med* 2005;46:667-74.
7. Yaghoubi SS, Barrio JR, Namavari M, Satyamurthy N, Phelps ME, Herschman HR, et al. Imaging progress of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase suicide gene therapy in living subjects with

- positron emission tomography. *Cancer Gene Ther* 2005;12:329-39.
8. Pantuck AJ, Matherly J, Zisman A, Nguyen D, Berger F, Gambhir SS, et al. Optimizing prostate cancer suicide gene therapy using herpes simplex virus thymidine kinase active site variants. *Hum Gene Ther* 2002;13:777-89.
 9. Colombo BM, Benedetti S, Ottolenghi S, Mora M, Pollo B, Poli G, et al. The "bystander effect": association of U-87 cell death with ganciclovir-mediated apoptosis of nearby cells and lack of effect in athymic mice. *Hum Gene Ther* 1995;6:763-72.
 10. Jacobs A, Voges J, Reszka R, Lercher M, Gossmann A, Kracht L, et al. Positron-emission tomography of vector-mediated gene expression in gene therapy for gliomas. *Lancet* 2001;358:727-9.
 11. Li Z, Shanmugam N, Katayose D, Huber B, Srivastava S, Cowan K, et al. Enzyme/prodrug gene therapy approach for breast cancer using a recombinant adenovirus expressing Escherichia coli cytosine deaminase. *Cancer Gene Ther* 1997;4:113-7.
 12. Beltinger C, Fulda S, Kammertoens T, Meyer E, Uckert W, Debatin KM. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96: 8699 - 8704.
 13. Culver KW, Ram Z, Wallvridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 1992;256:1550-2.
 14. Trask TW, Trask RP, Aguilar-Cordova E, Shine HD, Wyde PR, Goodman JC, et al. Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with current malignant brain tumors. *Mol Ther* 2000;1:195-203.
 15. Singh S, Cunningham C, Buchanan A, Jolly DJ, Nemunaitis J. Toxicity assessment of intratumoral injection of the herpes simplex type I thymidine kinase gene delivered by retrovirus in patients with refractory cancer. *Mol Ther* 2001;4:157-60.
 16. Miles BJ, Shalev M, Aguilar-Cordova E, Timme TL, Lee HM, Yang G, et al. Prostate-specific antigen response and systemic T cell activation after in situ gene therapy in prostate cancer patients failing radiotherapy. *Hum Gene Ther* 2001;12:1955-67.
 17. Alvarez RD, Gomez-Navarro J, Wang M, Barnes MN, Strong TV, Arani RB, et al. Adenoviral-mediated suicide gene therapy for ovarian cancer. *Mol Ther* 2000;2:524-30.
 18. Hasenburg A, Tong XW, Rojas-Martinez A, Nyberg-Hoffman C, Kieback CC, Kaplan A, et al. Thymidine kinase gene therapy with concomitant topotecan chemotherapy for recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther* 2000;7:839-44.
 19. Kuriyama S, Mitoro A, Yamazaki M, Tsujinoue H, Nakatani T, Akahane T, et al. Comparison of gene therapy with the herpes simplex virus thymidine kinase gene and the bacterial cytosine deaminase gene for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:1033-41.
 20. Trinh QT, Austin EA, Murray DM, Knick VC, Huber BE. Enzyme/prodrug gene therapy: comparison of cytosine deaminase/5-fluorocytosine versus thymidine kinase/ganciclovir enzyme/prodrug systems in a human colorectal carcinoma cell line. *Cancer Res* 1995;55:4808-12.
 21. Stackhouse MA, Pederson LC, Grizzle WE, Curiel DT, Gebert J, Haack K, et al. Fractionated radiation therapy in combination with adenoviral delivery of the cytosine deaminase gene and 5-fluorocytosine enhances cytotoxic and antitumor effects in human colorectal and cholangiocarcinoma models. *Gene Ther* 2000;7:1019-26.
 22. Crystal RG, Hirschowitz E, Lieberman M, Daly J, Kazam E, Henschke C, et al. Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the E. coli cytosine deaminase gene to metastatic colon carcinoma of the liver in association with the oral administration of the pro-drug 5-fluorocytosine. *Hum Gene Ther* 1997;8:985-1001.
 23. Freytag SO, Khil M, Stricker H, Peabody J, Menon M, DePeralta-Venturina M, et al. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. *Cancer Res* 2002;62:4968-76.
 24. Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, et al. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:12846-51.
 25. Cunningham C, Nemunaitis J. A phase I trial of genetically modified Salmonella typhimurium expressing cytosine deaminase (TAPET-CD, VNP20029) administered by intratumoral injection in combination with 5-fluorocytosine for patients with advanced or metastatic cancer. Protocol no: CL-017. Version: April 9, 2001. *Hum Gene Ther* 2001;12:1594-6.
 26. Nemunaitis J, Cunningham C, Senzer N, Kuhn J, Cramm J, Litz C, et al. Pilot trial of genetically modified, attenuated Salmonella expressing the E. coli cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer Gene Ther* 2003;10:737-44.
 27. Haberkorn U, Oberdorfer F, Gebert J, Morr I, Haack K, Weber K, et al. Monitoring gene therapy with cytosine deaminase: in vitro studies using tritiated-5-fluorocytosine. *J Nucl Med* 1996;37:87-94.
 28. Pang S, Dannull J, Kaboo R, Xie Y, Tso CL, Michel K, et al. Identification of a positive regulatory element responsible for tissue-specific expression of prostate-specific antigen. *Cancer Res* 1997;57:495-9.
 29. Adams JY, Johnson M, Sato M, Berger F, Gambhir SS, Carey M, et al. Visualization of advanced human prostate cancer lesions in living mice by a targeted gene transfer vector and optical imaging. *Nat Med* 2002;8:891-7.
 30. Wu L, Johnson M, Sato M. Transcriptionally targeted gene therapy to detect and treat cancer. *Trends Mol Med* 2003;9:421-9.
 31. Yang H, Berger F, Tran C, Gambhir SS, Sawyers CL. MicroPET imaging of prostate cancer in LNCAP-SR39TK-GFP mouse xenografts. *Prostate* 2003;55:39 - 47.
 32. Dmitriev I, Kashentseva E, Rogers BE, Krasnykh V, Curiel DT. Ectodomain of coxsackievirus and adenovirus receptor genetically fused to epidermal growth factor mediates adenovirus targeting to epidermal growth factor receptor-positive cells. *J Virol* 2000;74:6875-84.
 33. Bischoff JR, Kirn DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996;274:373-6.
 34. Lee CT, Lee YJ, Kwon SY, Lee J, Kim KI, Park KH, et al. In vivo imaging of adenovirus transduction and enhanced therapeutic efficacy of combination therapy with conditionally replicating adenovirus and adenovirus-p27. *Cancer Res* 2006;66:372-7.