

自杀基因治疗恶性肿瘤的载体效率及基因表达

杨文宇, 黄宗海

杨文宇, 黄宗海, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院普通外科
广东省广州市 510280
广东省自然科学基金重点资助项目, No. 013072
国家 863 计划项目, No. 2001AA217171
项目负责人: 黄宗海, 510280, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院普通外科. yangwenyugang@vip.sina.com
电话: 020-61643213
收稿日期: 2002-08-13 接受日期: 2002-08-29

摘要

如何利用基因载体选择性转移治疗基因, 并促使治疗基因在靶细胞中充分表达是自杀基因治疗恶性肿瘤的关键所在. 随着研究的深入发展, 各种基因载体的多方面特性逐渐展现在人们面前, 其携带外源基因进入靶细胞, 并在靶细胞中表达的过程也逐步被更清楚了解. 这些新认识指导科学者们在选择及改造载体, 调整各种影响因素等方面作了大量尝试, 取得诸多新认识, 大大加强了自杀基因针对肿瘤细胞的靶向性、高效性表达.

杨文宇, 黄宗海. 自杀基因治疗恶性肿瘤的载体效率及基因表达. 世界华人消化杂志 2004;12(1):194-198

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/194.asp>

0 引言

随着临床试验的深入开展, 基因治疗显然没有显示出当初人们所预期的高效神奇的疗效, 理论与实践的差距使这一技术在临床应用中仍然不能成功的满足实际需要, 相当程度上归因于载体应用上所面临的困难. 外源基因进入靶细胞基因组中须经历多个步骤: 体内传递至靶细胞、进入细胞、细胞内传递、进入细胞核; 因此也有多道屏障: 细胞外各种反应成分、细胞膜、细胞内环境以及核包膜. 理想载体要求能顺利高效的通过各道障碍, 在各个步骤中保持稳定、不激起不良反应, 且最有利于外源基因的高效、稳定或可控性表达. 对于应用自杀基因治疗恶性肿瘤来说, 载体的基因转移效率与外源基因的表达显得尤为重要. 正因为如此, 这一领域的研究近几年来在各国学者的努力下, 开展得如火如荼, 取得了丰富的经验与成果.

1 载体的基因转移能力

病毒载体基因转移能力与其滴度及转染率有关. 常用的载体中, 逆转录病毒载体转染率高, 但滴度不高(10^6 - 10^8), 而且只能感染分裂期细胞; 腺病毒载体滴度比较高(10^8 - 10^{10}), 但转染率中等; 腺相关病毒滴度较低, 各家报道不一致, 大致为 10^4 - 10^5 cfu/mL, 但具有较

高的转染率: Fukui et al^[1]应用腺相关病毒载体体外转运自杀基因治疗口腔鳞状细胞癌时观测到: 当 MOI=10 时, 该载体对 LacZ 基因的转移效率为 20-50%, 当 MOI=100 时, 几乎为 100%. 慢病毒(lentivirus)载体仍是具有争议的一种载体, 但其高效的基因转移能力却是非常可观的: Barry et al^[2]采用鼠逆转录病毒(murine retroviral)载体对 T 细胞进行 CD40 配基基因转染, 在采用巨细胞病毒启动子等强启动子的情况下, 转染效率仍然很低, 相同条件下, 低 MOI (0.5-2)的 lentivirus 载体即可取得 40-93% 的靶细胞被转染的效果. Loimas et al^[3]比较了多种不同的病毒载体携带 TK 基因、绿色荧光蛋白基因融合基因转染 3 种人前列腺癌细胞系(DU-145, LNCaP, PC-3)的有效性, 结果表明: 腺病毒载体和 lentiviral 载体对所有 3 种细胞系均具有高效转染作用, 而塞姆利基森林病毒载体(semliki forest virus vectors)和辛德毕斯病毒载体(sindbis virus vectors)仅产生百分之几的转基因阳性细胞.

一般认为非病毒载体的转移效率低, 限制了其在实际操作中的应用, Wright et al^[4]比较了裸 DNA、DNA/阳离子脂质体、DNA/转铁蛋白-阳离子脂质体、腺病毒载体重组子、腺相关病毒载体重组子、单纯疱疹病毒载体重组子对心肌的基因转移能力, 结果也证实了这一点. 但也有报道^[5]指出: 在转载 TK 基因体内治疗腹膜恶性肿瘤动物试验中, DNA/脂质体复合体与逆转录病毒产生细胞的基因转移效率没有显著差异; 在转运 TK 基因体内治疗胶质母细胞瘤动物试验中, 脂质体与腺病毒载体具有效果相当但优于逆转录病毒的杀瘤作用^[6]. 各种阳离子脂质体、分子共轭聚合物具有相对较高的基因转移能力; 裸 cDNA 在进入胞质后易被胞质核酸酶消化^[7], 转化能力较低.

2 载体效率的提高

载体携带外源基因, 在一定的反应环境中作用于靶细胞, 完成基因转移, 这一过程中, 无论是载体、环境因素还是靶细胞的改变都影响基因转移效率.

2.1 通过载体的改变 改良载体的某些特征可以大大提高基因转移效率. 研究者们在这方面作了大量的工作, 相关报道也最多.

2.1.1 病毒载体

2.1.1.1 特殊糖蛋白包裹 某些病毒包膜蛋白对肿瘤具有特殊的亲和力, 取之包被载体, 载体便也被赋予了这种特性. 如 Galipeau et al^[8]利用水泡性口炎病毒 G 蛋白

(vesicular stomatitis virus G, VSV-G)包装逆转录病毒载体, 产生的新载体既具有非常广泛的亲嗜性又能被超速离心浓聚而不变性, 达到 2.3×10^{10} cfu/mL, 用之携带TK基因和绿色荧光蛋白基因瘤内转染脑胶质瘤大鼠模型, 随后系统注射 GCV 10 d, 对照组(不用 GCV)大鼠全部死亡, 平均存活 38 d. 尸检发现巨大肿瘤被逆转录病毒高效转染, 荧光局限于肿瘤组织. 实验组 12 只大鼠中 8 只存活大于 120 d. Howard et al^[9]在构建了这种 VSV-G假型逆转录病毒载体(VSV-G-pseudotyped retrovirus vector)的基础上还构建了两其他病毒糖蛋白包裹的逆转录病毒载体: Moloney 鼠白血病病毒 4070A (MLV 4070A)和猫内源病毒 RD114 (CEV RD114)假型载体, 对胰腺癌细胞的体外以及动物体内试验表明, 这类假型逆转录病毒载体的确大大增强了转染效率, 提高了自杀基因对肿瘤的疗效, 而其中尤以 VSV-G 假型逆转录病毒载体显著.

2.1.1.2 改变其配基特性 许多病毒载体通过自身配基与肿瘤细胞表面相应的受体结合而进入肿瘤细胞, 但这一作用受肿瘤细胞表面受体表达情况影响. 改变载体的配基特征, 使之能与肿瘤细胞表面高表达的受体结合则能很好的解决这一问题. Nakamura et al^[10]的研究证实: 腺病毒的低转染效率与其主要受体柯萨奇-腺病毒受体(coxsackievirus-adenovirus receptor, CAR)缺乏具有高度相关性, 因此对决定腺病毒基因改变方向的腺病毒 5 型纤维蛋白(Adenovirus type 5 fiber protein)进行了改造, 在其结区(knob domain)HI 环插入一段含 Arg-Gly-Asp(RGD)的肽序列, 使病毒在进入细胞时能利用整合素受体, 改造后的载体对整合素高表达的肿瘤细胞转染力大大增强.

2.1.1.3 辅以特异的配基或抗体 恶性肿瘤细胞往往表现出受体表达异常. 因此, 不难理解, 将与其高表达或特异表达的受体相对应的配基与载体相连, 能有效的提高病毒载体的转染效率. 转铁蛋白(transferrin)^[11-12]是常用的配基, 再如胰岛素^[13]、叶酸盐(folate)^[11]、血管内皮生长因子^[14]、雌激素^[15]、4-羟基他莫昔芬^[16]、成纤维细胞生长因子^[17]等. 同样, 肿瘤细胞往往也表达特异的肿瘤抗原, 将对应的抗体连接到载体上, 既有利于自杀基因的靶向转导, 也无疑能增加转染效率. 抗肿瘤相关抗原抗体^[18]、抗转铁蛋白受体抗体^[19]等为常用的抗体.

2.1.1.4 保留复制能力 采用具有复制能力的腺病毒载体可以显著的提高其基因转移能力^[20-21]. 但也报道认为: 保留腺病毒载体的复制能力在体外试验中明显地增强了目的基因的转移作用, 在应用于体内时和传统腺病毒载体并没有显著性差异^[22]. Puhlmann et al^[23]应用携带萤光素酶, 具有复制能力的 TK-VV 重组子载体进行体外及动物体内多种肿瘤细胞系或皮下、腹腔、肝内多种移植瘤、转移瘤的转染试验, 并采用腹腔内、静脉内、瘤体内注射等多种方法, 结果表明这种保存了复制能力

的载体具有高效的基因转移及表达能力, 若灭活其复制能力, 瘤内外源基因的转染与表达则甚微.

2.1.1.5 载体小型化 载体的大小是否也影响转染效率? 理论上应该是这样, 近年来有人构建删除了TK基因的 VV 载体(thymidine kinase-deleted recombinant vaccinia virus, TK-VV)^[23-25], 这种小型化的 VV 载体突变体不仅具有高效的外源基因转移效率, 而且其转染的外源基因在靶细胞内具有高效的表达能力. Mangeot et al^[26]构建的小型 lentivirus 载体、Cui et al^[27]构建的能自我失活型 lentivirus 载体等, 在转染试验中都取得了非常好的效果. 但这只是经验与猜测, 重组子大小与转染效率之间的确切关系仍待进一步研究.

2.1.1.6 提高载体滴度 提高载体滴度一直是研究者们努力的方向, 其对载体基因转移的影响是不言而喻的. 纯化载体也不失为提高滴度的一种有效方法: 如 Kruse et al^[28]使用纯化 Re.TK 颗粒进行脑瘤治疗动物试验, 取得了可观的效果.

2.1.2 非病毒载体

2.1.2.1 载体的选择 一般来说, 带电荷的阳离子脂质体、多聚体比普通脂质体、裸 DNA 质粒基因转移效率高; 低分子量的多聚体比对应的高分子量多聚体效率高, 如: 低分子壳聚糖转运效率高于高分子壳聚糖^[29]; 低分子量、分支程度低的分支聚氮丙啶载体的转移效率更高^[30]. 壳聚糖由于其天然的高电荷性, 且在特定条件下可以浓缩 DNA, 形成不连续小颗粒^[31], 因此具有较高的效率; 线形聚氮丙啶也被认为是和裸 DNA、分支氮丙啶、脂质体 GL-67/DOPE、DOTAP/胆固醇相比效率最高的一种^[32].

2.1.2.2 辅以多种有效成分 可以与特异性配基、抗体相连, 也可以表面包被特种糖蛋白包膜提高肿瘤细胞亲嗜性, 或电中性物质以减少阳离子载体在血液中的非特异性反应^[33-34]; 同时, 最好既具有阳离子成分又有油脂成分, 前者使 DNA 凝缩, 有利于减少胞质内 DNA 酶解, 提高核膜透过能力; 后者能提高细胞膜亲嗜性, 有利于穿过细胞膜.

2.1.2.3 合适的 DNA/多聚载体比例 DNA/多聚体分子摩尔比与 DNA 转化效率也有明显关系. 如 Dizhe et al^[35]报道: 聚赖氨酸半乳糖[poly(L-Lys)Gal]d 的基因转移效率有赖于复合物内 DNA/半乳糖基聚赖氨酸摩尔比.

2.1.2.4 DNA 的大小和构型 线性 DNA 的广泛微注射研究显示, 大小是影响其胞质内移动、进入胞核的主要因素^[36]. 但是质粒 DNA 和经载体复合物运送的 DNA 是否也受其大小限制仍不清楚. 如果质粒 DNA 和载体复合物-DNA 进入细胞核是一个被动的弥散过程, 则显然 DNA 大小是重要的影响因素; 但超过 1.5 kb 的 DNA 片断很难透过核膜^[37-38], 大分子 DNA 进入细胞核主要是通过主动摄取而不是被动渗透. 另一方面, 我们知道: 阳离子等促使 DNA 凝缩的物质能提高 DNA 转化效率, 环状和超螺旋的 DNA 也被认为具有更高的转化效率, 因此,

DNA的构型影响其转染效率则是显然的。

2.1.2.5 与病毒载体联合构建融合载体 将非病毒载体和某些病毒联合构建的融合载体具有良好的基因转运性能: 如HJV-脂质体融合载体^[39]; HJV-阳离子脂质体^[39]; EBV复制子/PAAD融载体^[40-41]。

2.2 通过反应环境因素的改变 载体的基因转移效率与多种转染环境因素有关。如壳聚糖的转运效率与血清pH值等因素有关^[42, 31]; 聚赖氨酸半乳糖[poly(L-Lys)Gal]d的基因转移效率有赖于DNA-聚赖氨酸半乳糖复合物在不同离子强度下形成的结构^[35]等。因此, 可以通过调整这些因素来增强转染效率。另外, 采用什么样的给药方式使体外制备的重组子载体进入肿瘤体内也是不可忽视的影响因素, 具体的临床考虑应涉及多方面问题(如载体的靶向性如何? 毒副作用如何? 在体液内的稳定性如何? 肿瘤的解剖位置、血运状况、转移情况、瘤体大小以及个体特征等)。单就基因转移的效率而言, 则与弥散丢失, 非特异反应失活以及整合入非肿瘤细胞等相关。一般来说, 越是精确地, 小范围地局部注射越能减少丢失, 提高效率。若重组载体具有良好的靶向性与在体液环境中的稳定性, 则这一效应有所缓解。

2.3 通过靶细胞的改变 理论上, 既然外源基因的转染与靶细胞膜表面受体、蛋白质及多糖分子等的分布、胞质内环境、核膜、染色体等的状态有关, 则可以通过调整这些物质的性状来增强转染效率。体外试验中也经常利用各种物理或化学方法来实现这一目的, 但临床试验中这方面的报道较少。

3 自杀基因的表达

自杀基因作为一种外源基因, 在肿瘤细胞中的表达, 既与其本身特点, 如与之相连并共转染的载体类型、自身所带顺式作用元件的数量及在肿瘤细胞中的活性等相关, 也与被转染的肿瘤细胞的数量、肿瘤细胞类型等相关。为了增强自杀基因在肿瘤细胞中的表达, 除了针对不同的肿瘤细胞选择最佳载体外, 还常通过插入在肿瘤细胞中具有高活性的启动子、增强子以及可诱导性元件等实现这一目的。

3.1 载体本身对外源基因表达的影响 载体对所转运的

外源基因的表达具有重要影响, 各种载体转导的外源基因具有不同的表达特性(表1)。如逆转录病毒可整合宿主染色体, 外源基因可在宿主内稳定表达, 并随细胞分裂而传代。而且, Narita et al^[43]报道多腺苷酸信号(polyA)能增强定位于逆转录病毒长末端重复序列反方位的内源增强子介导的外源基因的表达: 他们将3种自杀基因置于midkine基因增强子的调控下, 内源转录单位的方向设计得与病毒长末端重复序列相反, 每种自杀基因在带有polyA的重组载体感染的包装细胞中的表达比在不带有polyA的重组载体感染的包装细胞中的表达明显增加, 由这种逆转录病毒携带TK基因转染后的肺癌细胞对GCV的敏感性获得显著的提高, 较之野生型载体转染的肺癌细胞也有显著性差异。一般来说, 腺病毒不能整合染色体, 外源基因较难长期表达, 不利于遗传病的治疗, 对自杀基因治疗也有不利影响。可同时应用两个腺病毒重组载体来增强外源基因的表达^[44]; 同时应用腺病毒和逆转录病毒载体重组子, 也有相似效果^[45]。腺相关病毒载体能整合入染色体, 外源基因能稳定表达。Xiao et al^[46]在小鼠基因转移试验中, 将腺相关病毒载体注射入骨骼肌组织后, 外源基因在小鼠体内1a之后仍有表达。据Qing et al^[47]的报道, 三羟(基)异黄酮能促进其所介导的外源基因在转染细胞内的表达。痘苗病毒载体不能整合染色体, 外源基因不能长期稳定表达, 且本身具有免疫原性, 不能多次反复使用。小型化的TK-VV载体, 在减小免疫原性、提高外源基因稳定性与高效性上有明显效果^[24-25, 48]。经Lentivirus载体转运的外源基因也能在宿主细胞中长期高效的表达^[49, 27]。

3.2 插入启动子、增强子、可诱导性元件 基因表达受多级调控, 因此外源基因的表达调控可以通过多途径、多环节的干预实现。其中, 利用特异性启动子、增强子等转录调控元件增强外源基因在肿瘤中的表达是最常用的方法。在外源基因中插入肿瘤中普遍高表达的基因启动子, 如端粒酶基因启动子^[50]; 或某一肿瘤特异表达的基因启动子, 如前列腺特异性膜抗原启动子^[51]、卵巢肿瘤的OSP1启动子^[52]; 或易在特定肿瘤环境中激活的可诱导性元件, 如在实体瘤高热瘤体中高活性的热休克蛋白70启动子^[53]; 或特定人工条件下激活的可诱导性元件, 如放射敏感性c-IAP2启动子^[54]等, 既加强

表1 各种载体基因转移特点

	逆转录病毒载体	腺病毒载体	腺相关病毒载体	痘苗病毒载体	慢病毒载体	非病毒载体
滴度	低	高	低	高	中等	-
基因导入效率 [*]	高	中等	高	高	高	低
稳定性	稳定	不稳定	稳定	不稳定	稳定	不稳定
基因表达水平	可变 ⁺	可变 ⁺	可变 ⁺	高	高	可变 ⁺
特点	只转染分裂期细胞	免疫原性强	需要辅助病毒滴度难以提高	具有溶细胞性免疫原性强		安全, 容量大生产经济

* 因细胞类型及反应条件而变化; + 基因表达与多种相关作用元件及反应因素有关。

了自杀基因的靶向性, 又大大增强自杀基因在肿瘤细胞中的表达。

整个转基因的过程是为了自杀基因在肿瘤细胞中表达, 但能否让自杀基因长期稳定表达往往并不是应用自杀基因治疗恶性肿瘤所考虑的重点, 适当时期内的高效表达却至关重要。大部分载体转染的外源基因的表达, 来不及走向衰减, 其导致的细胞毒性作用便已经将宿主细胞灭活。因此, 载体及其转移的自杀基因的细胞毒性往往成了影响表达持续时间的最重要因素, 由于自杀基因对肿瘤细胞的杀伤作用, 除了对转基因细胞的直接细胞毒性作用外, 更主要的往往有赖于旁杀伤作用, 载体的细胞毒性便直接影响着自杀基因治疗恶性肿瘤的最终疗效^[55]。

如上所述, 近些年来, 研究者在如何提高自杀基因针对肿瘤细胞的基因转移、基因表达效率上做了大量的工作, 并取得了丰硕的经验与成果。尽管如此, 目前的技术离人们所期望的还有一定距离, 还存在大量问题有待解决, 主要表现在: (1)机制不清 对于重组载体在细胞内的转运、进入细胞核等知之甚少, 而在这个过程中也许包含基因转移的某些关键点; (2)有待标准化载体构建细节、培养环境各参数值、各反应条件参数值、数据获取及分析的程序等的量化和统一, 以及标准化构建和培养的各型载体在明确有针对性的细胞分型和标准化反应环境、统计方式等条件下各方面性能的比较和量化; (3)应以临床应用为目标 各实验室都能成功的完成体外、体内试验, 但临床应用却久滞不前, 体外实验、动物实验与临床应用之间存在显著差别, 这要求我们更多的着眼于直接的临床数据而非单纯的实验室结果等。

在解决自杀基因的转移与表达效率的问题上, 还存在大量的工作要做。再有与之密不可分的靶向性问题、安全性问题、免疫原性问题等, 若这些问题都合理解决了, 自杀基因便能普遍应用于临床肿瘤的治疗, 造福于广大恶性肿瘤患者。

4 参考文献

- Fukui T, Hayashi Y, Kagami H, Yamamoto N, Fukuhara H, Tohnai I, Ueda M, Mizuno M, Yoshida J. Suicide gene therapy for human oral squamous cell carcinoma cell lines with adeno-associated virus vector. *Oral Oncol* 2001;37:211-215
- Barry SC, Seppen J, Ramesh N, Foster JL, Seyama K, Ochs HD, Garcia JV, Osborne WR. Lentiviral and murine retroviral transduction of T cells for expression of human CD40 ligand. *Hum Gene Ther* 2000;11:323-332
- Loimas S, Toppinen MR, Visakorpi T, Janne J, Wahlfors J. Human prostate carcinoma cells as targets for herpes simplex virus thymidine kinase-mediated suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2001;8:137-144
- Wright MJ, Wightman LM, Lilley C, de Alwis M, Hart SL, Miller A, Coffin RS, Thrasher A, Latchman DS, Marber MS. In vivo myocardial gene transfer: optimization, evaluation and direct comparison of gene transfer vectors. *Basic Res Cardiol* 2001;96:227-236
- Princen F, Lechanteur C, Lopez M, Gielen J, Bours V, Merville MP. Similar efficiency of DNA-liposome complexes and retrovirus-producing cells for HSV-tk suicide gene therapy of peritoneal carcinomatosis. *J Drug Target* 2000;8:79-89
- von-Eckardstein KL, Patt S, Zhu J, Zhang L, Cervos-Navarro J, Reszka R. Short-term neuropathological aspects of in vivo suicide gene transfer to the F98 rat glioblastoma using liposomal and viral vectors. *Histol Histopathol* 2001;16:735-744
- Pollard H, Toumaniantz G, Amos JL, Avet-Loiseau H, Guihard G, Behr JP, Escande D. Ca²⁺-sensitive cytosolic nucleases prevent efficient delivery to the nucleus of injected plasmids. *J Gene Med* 2001;3:153-164
- Galipeau J, Li H, Paquin A, Sicilia F, Karpatis G, Nalbantoglu J. Vesicular stomatitis virus G pseudotyped retrovector mediates effective in vivo suicide gene delivery in experimental brain cancer. *Cancer Res* 1999;59:2384-2394
- Howard BD, Boenicke L, Schniewind B, Henne-Bruns D, Kalthoff H. Transduction of human pancreatic tumor cells with vesicular stomatitis virus G-pseudotyped retroviral vectors containing a herpes simplex virus thymidine kinase mutant gene enhances bystander effects and sensitivity to ganciclovir. *Cancer Gene Ther* 2000;7:927-938
- Nakamura T, Sato K, Hamada H. Effective gene transfer to human melanomas via integrin-targeted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 2002;13:613-626
- Xu L, Pirollo KF, Chang EH. Tumor-targeted p53-gene therapy enhances the efficacy of conventional chemo/radiotherapy. *J Control Release* 2001;74:115-128
- Xu L, Pirollo KF, Tang WH, Rait A, Chang EH. Transferrin-liposome-mediated systemic p53 gene therapy in combination with radiation results in regression of human head and neck cancer xenografts. *Hum Gene Ther* 1999;10:2941-2952
- Yanagihara K, Cheng H, Cheng PW. Effects of epidermal growth factor, transferrin, and insulin on lipofection efficiency in human lung carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 2000;7:59-65
- Fisher KD, Ulbrich K, Subr V, Ward CM, Mautner V, Blackey D, Seymour LW. A versatile system for receptor-mediated gene delivery permits increased entry of DNA into target cells, enhanced delivery to the nucleus and elevated rates of transgene expression. *Gene Ther* 2000;7:1337-1350
- Brady H, Doubleday M, Gayo-Fung LM, Hickman M, Khammungskhane S, Kois A, Lipps S, Pierce S, Richard N, Shevlin G, Sutherland MK, Anderson DW, Bhagwat SS, Stein B. Differential response of estrogen receptors alpha and beta to SP500263, a novel potent selective estrogen receptor modulator. *Mol Pharmacol* 2002;61:562-568
- Putzer BM, Stiewe T, Crespo F, Esche H. Improved safety through tamoxifen-regulated induction of cytotoxic genes delivered by Ad vectors for cancer gene therapy. *Gene Ther* 2000;7:1317-1325
- Printz MA, Gonzalez AM, Cunningham M, Gu DL, Ong M, Pierce GF, Aukerman SL. Fibroblast growth factor 2-retargeted adenoviral vectors exhibit a modified biolocalization pattern and display reduced toxicity relative to native adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 2000;11:191-204
- Durrbach A, Angevin E, Poncet P, Rouleau M, Chavanel G, Chapel A, Thierry D, Gorter A, Hirsch R, Charpentier B, Senik A, Hirsch F. Antibody-mediated endocytosis of G250 tumor-associated antigen allows targeted gene transfer to human renal cell carcinoma in vitro. *Cancer Gene Ther* 1999;6:564-571
- Xu L, Tang WH, Huang CC, Alexander W, Xiang LM, Pirollo KF, Rait A, Chang EH. Systemic p53 gene therapy of cancer with immunolipoplexes targeted by anti-transferrin receptor scFv. *Mol Med* 2001;7:723-748
- Lee YJ, Galoforo SS, Battle P, Lee H, Corry PM, Jessup JM. Replicating adenoviral vector-mediated transfer of a heat-inducible double suicide gene for gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2001;8:397-404
- Morris JC, Wildner O. Therapy of head and neck squamous cell carcinoma with an oncolytic adenovirus expressing HSV-tk. *Mol Ther* 2000;1:56-62
- Lambright ES, Amin K, Wiewrodt R, Force SD, Lanuti M, Probert KJ, Litzky L, Kaiser LR, Albelda SM. Inclusion of the herpes simplex thymidine kinase gene in a replicating adenovirus does not augment antitumor efficacy. *Gene Ther* 2001;8:946-953

- 23 Puhlmann M, Brown CK, Gnant M, Huang J, Libutti SK, Alexander HR, Links HR, Bartlett DL. Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant. *Cancer Gene Ther* 2000;7:66-73
- 24 Gnant MF, Puhlmann M, Alexander HR, Bartlett DL Jr. Systemic administration of a recombinant vaccinia virus expressing the cytosine deaminase gene and subsequent treatment with 5-fluorocytosine leads to tumor-specific gene expression and prolongation of survival in mice. *Cancer Res* 1999;59:3396-3403
- 25 Gnant MF, Puhlmann M, Bartlett DL, Alexander HR Jr. Regional versus systemic delivery of recombinant vaccinia virus as suicide gene therapy for murine liver metastases. *Ann Surg* 1999;230:352-360
- 26 Mangeot PE, Negre D, Dubois B, Winter AJ, Leissner P, Mehtali M, Kaiserlian D, Cosset FL, Darlix JL. Development of minimal lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for gene transfer into human dendritic cells. *J Virol* 2000;74:8307-8315
- 27 Cui Y, Golob J, Kelleher E, Ye Z, Pardoll D, Cheng L. Targeting transgene expression to antigen-presenting cells derived from lentivirus-transduced engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* 2002;99:399-408
- 28 Kruse CA, Lamb C, Hogan S, Smiley WR, Kleinschmidt-Demasters BK, Burrows FJ. Purified herpes simplex thymidine kinase retroviral particles. II. Influence of clinical parameters and bystander killing mechanisms. *Cancer Gene Ther* 2000;7:118-127
- 29 Lee M, Nah JW, Kwon Y, Koh JJ, Ko KS, Kim SW. Water-soluble and low molecular weight chitosan-based plasmid DNA delivery. *Pharm Res* 2001;18:427-431
- 30 Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsasser HP, Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res* 1999;16:1273-1279
- 31 Erbacher P, Zou S, Bettinger T, Steffan AM, Remy JS. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res* 1998;15:1332-1339
- 32 Uduehi AN, Stammberger U, Frese S, Schmid RA. Efficiency of non-viral gene delivery systems to rat lungs. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001;20:159-163
- 33 Shi N, Boado RJ, Pardridge WM. Receptor-mediated gene targeting to tissues in vivo following intravenous administration of pegylated immunoliposomes. *Pharm Res* 2001;18:1091-1095
- 34 Kircheis R, Wightman L, Kursu M, Ostermann E, Wagner E. Tumor-targeted gene delivery: an attractive strategy to use highly active effector molecules in cancer treatment. *Gene Ther* 2002;9:731-735
- 35 Dizhe EB, Akifiev BN, Missul BV, Orlov SV, Kidgotko OV, Links Sukonina VE, Denisenko AD, Perevozchikov AP. Receptor-mediated transfer of galactosylated poly-L-lysine complexes DNA- into mammalian cells in vitro and in vivo. *Biochemistry (Mosc)* 2001; 66:55-61
- 36 Lukacs GL, Haggie P, Seksek O, Lechardeur D, Freedman N, Verkman AS. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 2000;275:1625-1629
- 37 Ludtke JJ, Zhang GF, Sebestyen MG, Wolff JA. A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA. *J Cell Sci* 1999;112(Pt 12):2033-2041
- 38 Lonetti JP, Mechtli N, Degols G, Gabor C, Lebleu B. Intracellular distribution of microinjected antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2702-2706
- 39 Kaneda Y. Improvements in gene therapy technologies. *Mol Urol* 2001;5:85-89
- 40 Harada Y, Iwai M, Tanaka S, Okanoue T, Kashima K, Maruyama-Tabata H, Hirai H, Satoh E, Imanishi J, Mazda O. Highly efficient suicide gene expression in hepatocellular carcinoma cells by epstein-barr virus-based plasmid vectors combined with polyamidoamine dendrimer. *Cancer Gene Ther* 2000;7:27-36
- 41 Maruyama-Tabata H, Harada Y, Matsumura T, Satoh E, Cui F, Iwai M, Kita M, Hibi S, Imanishi J, Sawada T, Mazda O. Effective suicide gene therapy in vivo by EBV-based plasmid vector coupled with polyamidoamine dendrimer. *Gene Ther* 2000;7:53-60
- 42 Ishii T, Okahata Y, Sato T. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1514:51-64
- 43 Narita M, Takanaga K, Yoshida Y, Kadomatsu K, Muramatsu T, Matsubara S, Hamada H, Goto S, Saisho H, Sakiyama S, Tagawa M. Polyadenylation signal facilitates the expression of foreign gene that is driven by an internal promoter located in the reverse orientation to long terminal repeat of retrovirus. *Anticancer Res* 2000;20:279-282
- 44 Sakai Y, Kaneko S, Sato Y, Kanegae Y, Tamaoki T, Saito I, Kobayashi K. Gene therapy for hepatocellular carcinoma using two recombinant adenovirus vectors with alpha-fetoprotein promoter and Cre/lox P system. *J Virol Methods* 2001; 92:5-17
- 45 Carrio M, Romagosa A, Mercade E, Mazo A, Nadal M, Gomez-Foix AM, Fillat C. Enhanced pancreatic tumor regression by a combination of adenovirus and retrovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Gene Ther* 1999;6:547-553
- 46 Xiao X, Li J, Samulski RJ. Efficient long term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* 1996;70:8098-8108
- 47 Qing K, Khuntirat B, Mah C, Kube DM, Wang XS, Ponnazhagan S, Links Zhou S, Dwarki VJ, Yoder MC, Srivastava A. Adeno-associated virus type 2 -mediated gene transfer: correlation of tyrosine phosphorylation of the cellular single-stranded D sequence-binding protein with transgene expression in human cells in vitro and murine tissues in vivo. *J Virol* 1998;72:1593-1599
- 48 Puhlmann M, Brown CK, Gnant M, Huang J, Libutti SK, Alexander HR, Bartlett DL. Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant. *Cancer Gene Ther* 2000;7:66-73
- 49 Kafri T. Lentivirus vectors: difficulties and hopes before clinical trials. *Curr Opin Mol Ther* 2001;3:316-326
- 50 Plumb JA, Bilsland A, Kakani R, Zhao J, Glasspool RM, Knox RJ, Evans TR, Keith WN. Telomerase-specific suicide gene therapy vectors expressing bacterial nitroreductase sensitize human cancer cells to the pro-drug CB1954. *Oncogene* 2001; 20:7797-7803
- 51 Uchida A, O'Keefe DS, Bacich DJ, Molloy PL, Heston WD. In vivo suicide gene therapy model using a newly discovered prostate-specific membrane antigen promoter/enhancer: a potential alternative approach to androgen deprivation therapy. *Urology* 2001;58(2 Suppl 1):132-139
- 52 Bao R, Selvakumaran M, Hamilton TC. Targeted gene therapy of ovarian cancer using an ovarian-specific promoter. *Gynecol Oncol* 2002;84:228-234
- 53 Lee YJ, Galoforo SS, Battle P, Lee H, Corry PM, Jessup JM. Replicating adenoviral vector-mediated transfer of a heat-inducible double suicide gene for gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2001;8:397-404
- 54 Ueda T, Akiyama N, Sai H, Oya N, Noda M, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. c-IAP2 is induced by ionizing radiation through NF-kappaB binding sites. *FEBS Lett* 2001;491:40-44
- 55 Moriuchi S, Krisky DM, Marconi PC, Tamura M, Shimizu K, Yoshimine T, Cohen JB, Glorioso JC. HSV vector cytotoxicity is inversely correlated with effective TK/GCV suicide gene therapy of rat gliosarcoma. *Gene Ther* 2000;7:1483-1490