

## 아데노바이러스 유전자치료제의 독성

정 인 재\*

덕성여자대학교 약학대학

## Toxicity of the Adenoviral Vector Mediated Gene Therapy

Injae Chung\*

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

### ABSTRACT

Adenoviral vector (AdV) has been the most widely used viral vector for delivering an exogenous therapeutic gene to human. As of this date, more clinical trials utilize recombinant AdV to treat cancer and monogenic inherited disease as well as vaccine applications. However, the number of clinical trials had dropped markedly following the tragic death of a patient ongoing an AdV therapy for the treatment of an ornithine transcarbamylase deficiency (OTCD). This review is an attempt to provide the information on toxicity generated by AdV-mediated gene transfer. It would serve as a sobering reality to researchers and clinicians exploring the use of AdV, as to the complications involved in human application.

**Key words :** adenoviral vector, toxicity, gene therapy, safety

### 서 론

유전자 전이 (gene transfer)를 위해 바이러스 벡터를 사용한다는 것은 단순한 개념이라고 할 수 있다. 즉, 기대하는 치료 효과를 얻기 위해 전이하고자 하는 유전자를 바이러스 게놈에 삽입을 한 후, 본래 바이러스가 지니고 있는 세포 변환 능력을 활용하는 것이다. 바이러스 벡터 중 아데노바이러스 벡터 (adenoviral vector, AdV)는 유전자치료 (gene therapy)에서 외래성 치료 유전자 (therapeutic gene)를 인체에 전달하는 데 가장 많이 사용되고 있는 전달도구이다. AdV를 매개한 유전자치료의

적용 대상 범위도 암뿐만이 아니라 단일유전성 유전질환, 최근에는 백신으로 까지 확대되고 있다.

1990년 유전자치료제의 임상실험이 첫 실시 이후로 거의 30년이 되어가고 있다. 다양한 유전자 전달 기구들이 개발되었고, 여러 질환을 대상으로 치료제가 개발되었다. AdV는 유전자 전달 방법으로 가장 많이 사용되어 유전자치료제의 개발에 많은 기여를 한 반면, 한참 발전 일로에 있던 유전자 치료 분야에 가장 악영향을 끼친 것도 AdV를 매개로 개발된 치료제의 임상실험이었다. 미국 University of Pennsylvania에서 선천성 유전 질환인 ornithine transcarbamylase deficiency (OTCD) 임상 실험 도중 발생한 사망사건이다. AdV의 과다용량 투여 (총  $4 \times 10^{13}$  viral particle, vp)로 인한 사망사건이었다. 면역 활성화로 인한 염증반응으로 야기된 급성호흡기장애가 직접적인 사망원인으로 추정되

\* To whom correspondence should be addressed.  
Tel: +82-2-901-8522, Fax: +82-2-901-8386  
E-mail: ijchung@duksung.ac.kr

었다. 국가기관으로부터 승인 받은 protocol을 준수하지 않고 고용량을 투여한 것이다. University of Pennsylvania에서 진행되었던 모든 유전자치료의 임상실험은 이 사망사건 이후로 중단되었다.

세계 최초로 시장 판매 허가를 받은 유전자치료제는 중국 심천에 있는 Shenzhen SiBiono GenTech사의 AdV-p53 (Pearson *et al.*, 2004)이다. AdV-p53는 종양억제유전자인 p53을 AdV에 재조합한 것이다. P53 단백질의 발견에서부터 유전자치료제로의 개발, 임상실험 등은 미국에서 주도하였고 엄청난 개발 비용을 들였지만 시장 판매 허가의 주관심이 암환자의 생존율이었던 미국에서는 허가가 나오지 않았다. 한편, 정부와 회사 간의 긴밀한 협조뿐 아니라 허가의 주요 기준 사항이 증상 호전이었던 중국에서 첫 제품이 시장에 나오게 된 것이다.

본 연구에서는 백신 치료와 유전자치료의 전달 도구로 다용되고 있는 재조합 AdV치료제의 독성을 고찰하여 향후 이 분야의 안전성 확보와 효능 향상을 위한 정보를 제공하고자 한다.

## 본 론

### 1. AdV의 특징

유전자 전달 도구로서 아데노바이러스 벡터의 특징은 세포의 분열 상태와 상관없이 모든 세포에 치료유전자를 잘 전달하고, 동물 또는 사람의 게놈 DNA에 삽입되지 않으며, 유전자를 재조합할 수 있는 역량이 크며, 비교적 안정하고, 역가(titer)가 높은 재조합 바이러스를 생산할 수 있다는 것이다. 아데노바이러스 벡터 자체의 안전성(safety)과 치료 유효성(efficacy)을 높이기 위해 지속적으로 아데노바이러스의 DNA에 변형을 가해 왔다. 동물과 사람에게 투여된 후 일어나는 면역반응을 감소하기 위해 바이러스 DNA 가운데 불필요한 부분은 점차적으로 삭제를 하였다. 바이러스의 자기 복제(replication)에 필요한 부분을 삭제하여 약 7kb 정도의 치료유전자를 재조합할 수 있는 제1세대 벡터로부터 거의 전체 바이러스 DNA를 삭제하여 36 kb의 유전자를 재조합할 수 있는 제3세대 벡터까지 개발되었다(McConnell and Imperiale, 2004).

### 2. AdV 안전성과 replication competent AdV (RCA)

AdV의 안전성과 관련하여 벡터 생산 과정에서 혼입될 수 있는 RCA 문제는 매우 중요하다(Dormond *et al.*, 2009). AdV 제조를 할 때, 바이러스 유전체 중 E1 부위를 부분적 또는 전체적으로 삭제하여 바이러스가 스스로 자가 복제되지 못하도록 함으로써(replication incompetent) 재조합 벡터의 안전성을 확보해 왔다. 재조합바이러스의 제조는 따라서 삭제된 E1 유전자가 세포의 유전체에 삽입이 되어 E1 단백질을 제공해 줄 수 있는 세포주에서 이루어진다. 간혹 E1 유전자 부위를 이용하여 AdV와 세포주 게놈 사이의 상동재조합을 통해 AdV가 E1 유전자를 다시 취득하여 자가복제가 스스로 가능한 AdV(replication competent AdV)가 발생하기도 한다.

임상 적용을 위한 제조품에 RCA이 혼입되어 있지 않도록 제조 및 품질 전 공정을 철저히 관리해야 한다. RCA는 인체 조직에서 스스로 복제되어 다른 부위로 퍼져 면역반응 등의 독성을 야기할 수도 있다. 세포주를 이용한 제조 과정에서도 RCA는 복제 불능하게 재조합된 AdV보다 증폭 우위에 있어 정상 제조에 지장을 초래한다. 미국 FDA는 임상용 제조품의 경우  $3 \times 10^{10}$  viral particle (vp) 당 1의 RCA로 제한하고 있다. 또한, 임상실험에서는 환자 당  $10^{12} \sim 10^{13}$  vp 또는  $10^{10} \sim 10^{11}$  plaque forming units (pfu) 정도의 많은 양의 임상실험 등급 재조합벡터가 필요하며, 이에 부합하기 위해서는 GMP(good manufacturing practice)에 규정에 맞는 효율적이면서 확립된 공정이 필요하다.

### 3. 해부학적 특징과 AdV의 독성

원하는 장기로의 전달을 높이기 위해 조직 표적을 변형한 AdV라 해도 결국 간으로 모여 심각한 독성을 야기할 수 있다(Fechner *et al.*, 1999; Massari *et al.*, 2002).

AdV의 세포로의 도입에는 주요 두 단계로 이루어진 과정을 거친다. 세포 표면에 존재하는 coxsackie adenovirus receptor (CAR) 단백질을 통해 AdV가 세포에 부착하고 이어서  $\alpha\beta 3$ 와  $\alpha\beta 5$  integrins에 의해 세포로 내재화한다(Wickman *et al.*, 1993; Bergelson *et al.*, 1997). Fechner *et al.* (1999)에 의하

면 AdV를 특수한 부위에 직접 주사한 경우가 아닌 정맥주사처럼 전신투여한 경우에는 상기한 CAR,  $\alpha\text{v}\beta 3$  및  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrins의 존재뿐 아니라 해부학적 방어 또한 AdV가 도입되는 기관을 결정하는 중요한 변수라는 것이다. 근육, 폐, 뇌 및 심장의 혈관 내피는 매우 치밀하고 혈관은 밀집한 결합조직에 의해 둘러싸여 있다. 이러한 해부학적 특징으로 인해 직접주사투여가 아닌 이상 이들 기관으로의 AdV 도입은 상당히 저하되거나 심지어 완전 차단되어 있다. 반면 간, 비장, 골수 등은 지름 100 nm 까지의 큰 구멍을 가지고 있고, 넓은 그물망의 기저막과 성긴 결합조직을 가지고 있어 그 보다 작은 크기인 AdV가 쉽게 이들 장기에 접근할 수 있다. 그러나 CAR,  $\alpha\text{v}\beta 3$  및  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrins을 가지고 있는 간에는 쉽게 AdV가 도입되나, 비장에는 이들 수용체의 발현이 거의 없어 AdV의 도입이 거의 일어나지 않는다.

해부학적 구조를 잘 이해하여 장애를 극복하고 심근이나 기도의 상피에 외상이 없이 유전자전이가 이루어질 수 있는 방안이 마련되고 실험의 디자인이 이루어져야 한다. 뿐만 아니라 AdV에 의한 독성 발생 예측과 연구 계획에도 해부학적 특징이 고려되어야 한다고 하겠다.

#### 4. AdV 투여 경로와 독성

상기한 해부학적 구조와 관련해서 투여 경로가 어떤 세포들이 AdV의 표적이 되는가에 상당한 영향을 미친다. 예를 들어, 정맥주사로 투여된 AdV의 90% 이상은 간으로 가서 주로 hepatocyte에 도입이 되고, 나머지는 Kupffer세포로 간다. 근육주사인 경우에는 대부분 주사 부위의 골격근세포에 도입된다.

1차 접종원이 2차 임파계 기관에 도달하게 되면, macrophages와 dendritic cell와 같이 골수에서 유래한 antigen presenting cell (APC) 중 상당수가 AdV를 도입한다. 비장의 (splenic) APC에 AdV이 도입되는 것이 급성 염증성 cytokine 방출과 dendritic 세포의 활성화와 깊은 관련이 있다 (Tripathy *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2001).

Table 1은 전임상 동물실험에서 관찰된 재조합 AdV의 독성을 정리한 것이다. Morrissey *et al.* (2002a)의 보고에 의하면 p53를 지니고 있는 AdV

를 pig에 투여했을 때 투여한 경로에 따른 독성의 차이가 있음을 알 수 있다. 복강내 주사 (intraperitoneal injection)의 경우 항체의 증가와 염증반응이 관찰되었고, 간내주사 (intrahepatic injection)의 경우 급성 심혈관과 혈류역학의 이상이 발견되었다. 또한 같은 재조합벡터를 랫트에 정맥주사를 하면 무기력, 연변 (soft feces), 엉크러진 털 (ruffled-hair coat) 및 사망 등이 보고되었다 (Morrissey *et al.*, 2002b).

#### 5. 고용량의 AdV 투여와 독성 발생

일단 아데노바이러스를 비롯한 모든 바이러스 벡터들은 고용량에서 면역반응을 야기할 가능성이 매우 높다. AdV는 생물학적 안전성 데이터에도 불구하고 임상적으로 효능을 나타내는 데 필요한 용량인  $10^{12}$  vp를 정맥주사로 투여할 때 일시적 간염과 혈액 응고현상을 보였다 (Gomez-Manzano *et al.*, 2004; Markus *et al.*, 2007). 1999년 ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency 임상실험 도중 불행하게도 사망한 사건은 임상에서 고용량의 AdV 투여하는 것에 대한 잠재적 위험성에 대한 경종이다. 임상에서 아데노바이러스 감염은 큰 문제가 되지 않지만, 혈관내로 직접 투여될 경우에는 인체의 내재 방어시스템을 거치지 못하게 되어 치명적인 전신 반응을 초래하게 되는 것이다.

#### 6. AdV에 대한 선재한 면역성과 독성

임상에서 AdV 활용하는 데 있어 장애가 되는 것 중 하나가 인체에 투여된 후 기존에 있는 항체에 의해 신속히 무효화 되는 것이다. 따라서, 이미 선재한 면역성 (pre-existing immunity)은 치료효능에 장애가 된다. 그러나 이것은 동시에 과도한 독성을 일으키는 원인으로 작용한다. Vlachaki *et al.* (2002)에 의하면, 유방암세포를 피하에 이종이식한 Balb/c 마우스를 사람에게 투여된 최고 용량에 해당되는  $2 \sim 6 \times 10^{11}$  vp의 AdV로 처치했을 때, 면역 처리가 안 된 마우스의 사망률이 15%인 것과 비교하여, 미리 면역시킨 마우스에서는 독성이 상당히 증가되어 약 60%의 사망률을 보임을 알 수 있다. 또한 선재한 면역성은 AdV가 말초 기관으로 도입되는 것을 저하시켰는데, 이는 AdV에 재조합된 외래 유전자의 전신적 유전자발현의 감소를 가져올 수 있다. 간독성도 면역 선재군에서 증가됨이 관찰되어,

**Table 1.** Toxicities observed in preclinical study

Vector	Insert	Dose	Delivery	Toxicity	Species	Reference
IG.Ad. MLPI.TK	thymidine kinase	$1 \sim 2.5 \times 10^{10}$ pfu	intra- cerebral	viral meningitis	monkey	Driesse <i>et al.</i> (1998)
Ad.tk	thymidine kinase	$2 \times 10^7$ pfu	intra- cerebral	chronic brain inflammation, loss of myelin fibers, persistent transgene expression	mice	Dewey <i>et al.</i> (1999)
Ad.β-gal	β-galactosidase	$10^6 \sim 10^9$ pfu	intra- cerebral	acute neuronal and glial cell cytotoxicity, chronic inflammation	rat	Thomas <i>et al.</i> (2001)
AdexCalaZ	β-galactosidase	$10^{12} \sim 10^{13}$ vp	i.v. (iliac)	death	rat	Garcia-Banuelos <i>et al.</i> (2002)
AdV-luc	luciferase	$2 \sim 6 \times 10^{11}$ vp	intra- tumoral	liver toxicity, mortality ↑, systemic transduction ↓	immunized mice	Vlachaki <i>et al.</i> (2002)
SCH58500	p53	$3 \times 10^8$ pfu/kg	i.p.	antibody ↑, inflammatory response	pig	Morrissey <i>et al.</i> (2002a)
		$1.5 \times 10^{12}$ vp/kg	intrahepa- atic	acute cardiovascular & hemodynamic effect		
SCH58500	p53	$1.1 \times 10^{12}$ pfu/kg	I.v. (tail)	lethargy, soft feces, ruffled-hair coat, death	rat	Morrissey <i>et al.</i> (2002b)
Ad-LacZ	β-galactosidase	$2 \times 10^9$ pfu	i.v.	CTL exhaustion	mice	Krebs <i>et al.</i> (2005)
Ad5/3-Δ24	conditionally replicating AdV	$3 \times 10^7$ vp	i.p.	liver & bone marrow toxicity	mice	Raki <i>et al.</i> (2005)
AdCMV- Luc	luciferase	$1 \times 10^{11}$ vp/kg	i.v. (tail)	Kupffer cell necrosis	mice	Manickan <i>et al.</i> (2006)
HAdV-5	β-galactosidase	$5.7 \times 10^{12}$ vp/kg	i.v. (tail)	death	rat	Boquet <i>et al.</i> (2008)
SG600-p53	replication competent, p53	$2.5 \times 10^{13}$ vp/kg	i.v.	cathexia, activity ↓, eye closure	mice	Su <i>et al.</i> (2008)

AdV, adenoviral vector; CTL, cytotoxic T lymphocyte; iv, intravenous; ip, intraperitoneal; PFU, plaque forming units; VP, viral particle.

조직학적 검경으로 2~3도 간독성과 간효소의 평균치 증가가 있었다.

## 7. 병용요법시 치료제의 투여순서와 독성

Raki *et al.* (2005)는 조건적으로 복제 가능한 AdV (conditionally replication competent AdV, CRAdV)

의 투여로 인한 간독성에 대해 보고하였다. 난소암 이종이식 SCID 마우스에 Ad5/3-Δ24와 항암제 gemcitabin를 병용한 경우였는데, 두 가지 요법의 투여 순서가 항암효능과 간독성 발생에 크게 영향을 미쳤다. Gemcitabin을 먼저 투여한 후 Ad5/3-Δ24를 처치했을 때 큰 독성 없이 최대의 암억제효과를 얻었다. 이 연구는 임상 병용요법에서 투여

순서의 중요성을 강조한다고 하겠다.

## 8. 지연성 독성의 출현

Dewey *et al.* (1999)은 신경교종(glioma) 치료 목적으로 herpes simplex virus I thymidine kinase 유전자를 내포한 AdV를 사용하였다. 종양 성장 억제효과를 관찰한 후 진행된 독성 연구의 결과를 보고하였다. 성공적인 신경교종 역제가 관찰된 3개월 후에 활성 뇌염이 진행 중이었던 것을 발견하였다. 지연성 독성으로 만성 뇌염이 관찰된 것뿐 아니라 백터에 삽입되었던 herpes simplex virus I thymidine kinase 유전자가 지속적으로 발현되고 있었다. 이는 AdV 유전자치료 이후 비교적 장기적인(long-term) 영향에 대한 연구를 한 것이다. 이 보고는 뇌와 같은 예민한 부위에 바이러스 백터를 적용할 때 더욱 주의 관찰이 필요함을 시사하고 있다. 상기 유전자치료제의 임상 적용을 고려할 때 전임상 동물실험에서 나타난 항암효능뿐 아니라 장기적인 활성 뇌염, myelin 섬유 소실 및 지속적인 삽입 유전자의 지속적 발현과 같은 독성이나 부작용 문제를 고려하여 임상 실험을 계획하고 환자를 평가해야 함을 보여준다.

## 9. OTCD 임상실험과 독성

유전자치료 역사에서 가장 충격적인 사건은 OTCD 임상실험 도중 18세의 남성 환자가 사망한 것이다. 사용된 백터는 E1과 E4이 제거된 AdV에 사람의 OTC cDNA가 재조합된 것이다. 우측 간동맥을 통해  $2 \times 10^9$ 에서  $6 \times 10^{11}$  particles/kg가 투여되었다. 사망 사건으로 인해 중단되었던 OTCD 임상실험에서 관찰된 독성에 관하여 살펴보면 다음과 같다(Raper *et al.*, 2002, 2003; Raper, 2005). 전신적인 염증 반응이 있었다. 증세가 약하고 일시적이고, 투여용량과는 상관관계가 없는 백터 유도성 간염과 전혀 예상치 못했던 저인산혈증(hypophosphatemia) 및 혈소판감소증(thrombocytopenia)이 나타났다. 그 외 발열과 근육통도 보고되었다. 마지막 사망한 환자의 경우에는  $6 \times 10^{11}$  particles/kg의 백터가 투여된 직후, 이전 17명의 다른 환자에서도 나타났었던 발열과 근육통이 있었다. 18시간에서 24시간 이후에는 다른 환자에게는 전혀 나타나지 않았던 혈액 응고, 간 손상 특히 황달, 정신이상

및 고암모니아혈증(hyperammonemia)이 나타났다. 3일 후, 돌발성이며 비가역적인 호흡기계 장애와 여러 기관의 기능부전을 보이며 사망에 이르렀다. 사고 직후 임상실험에 참여했던 환자들의 혈청 샘플에 대한 재검사를 실시했는데, 염증성 IL-6와 IL-10의 증가가 백터 투여 후 2~4시간에 모든 환자에서 측정되었다. 사망한 환자의 부검결과 폐와 간의 심한 손상, 광범위한 비장 경색, 그리고 골수, 비장 및 임파절 등과 같은 간이외의 조직에서 상당한 양의 백터가 검출되었고, 골수에서 급격한 적혈구 전구체의 감소가 있었다.

이 사건에서 지적되어져야 할 중요한 문제점은 정부기관에서 승인 받은 protocol을 준수하지 않고 총  $4 \times 10^{13}$  vp라는 초과용량의 백터가 사망한 환자에게 투여되었다는 것이다. 그 외 임상에서의 나타날 반응을 미리 예측할 만한 동물실험 연구의 한계, 가파른 AdV의 독성 커브, 즉 매우 낮은 안전계수, 전신 투여된 백터에 대한 실질적인 사람들 간의 반응의 차이 및 바이러스백터에 대한 면역반응에 관한 연구의 필요성 등이 해결되어야 할 숙제로 남아 있다.

## 결 론

AdV 유전자치료제와 관련된 독성 연구 보고는 우선 발표 논문 수만 고려해도 기대보다 훨씬 밀도는 수준이었다. 대부분의 동물실험에서 수행된 독성 연구 결과를 분석해 보면 ‘사망 아니면 독성이 없다’이었다. 이를 근거로 임상실험으로 진행된 것들이 많았다. 사망을 야기하기 전 단계의 용량의 AdV를 투여한 후 세심히 독성을 고찰하는 과정이 생략된 채 임상실험을 실행하여 예상하지 못한 잠재적 독성을 경험하게 된 것이다. 제한적이기는 하지만 Table 1의 전임상실험의 연구 보고에 의하면, AdV를 인체에 적용하는 것은 항상 잠재적 위험이 따름을 알 수 있다. AdV와 재조합된 외래 유전자의 종류에 따라라도 면역유발 정도와 나타나는 독성의 형태에도 차이가 있음도 알 수 있다. AdV를 포함하여 바이러스 백터를 이용한 유전자치료 분야의 진보를 촉진하고 위해/이익의 비율(risks-benefit ratio)에 대한 정보를 제공하기 위해서, 전임상실험 데이터와 임상실험 제안서를 관련 지식이 풍부

하며 이해관계가 없는 동료에 의한 세밀한 검토가 반드시 필요하다고 하겠다.

안전성 약리학(safety pharmacology)은 최근 빠르게 발전하고 있는 분야이다. 치료로 인한 risk/benefit 평가를 위한 정보 제공하기 위해 데이터를 산출하는 규제 과정에서 약리학의 기본 원리를 활용하는 분야이다. 안전성 약리학의 목적은 지속적으로 출현하고 있는 방법들을 이용하여 약물의 부작용이나 독성에 있어 pharmacodynamic/pharmacokinetic 관계의 특징을 규명하는 것이다. 독성학(toxicology)과는 달리 안전성 약리학은 흔하지 않은 사망의 위험을 예측하기 위해 규제적 요구사항을 포함하고 있다는 것이다. 안전성 약리학의 주요 문제는 1) 원하지 않는 영향이 나타날 경향의 발견, 2) 수집된 자료를 안전계수로 전환 및 3) 임상에서 안전성 모니터링 등이다. AdV를 포함하여 현재 활발히 개발되고 있는 유전자치료제나 항체와 같은 생물학적 제제의 안전성 테스트도 안전성 약리학의 개념을 바탕으로 이루어져야 하겠다.

### Abbreviations

AdV, adenoviral vector; ornithine transcarbamylase deficiency (OTCD); PFU, plaque forming units; VP, viral particle;

### 감사의 글

본 연구는 덕성여자대학교 2007년 교내연구비 지원을 받은 과제입니다.

### 참고 문헌

- Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL and Finberg RW. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5, *Science* 1997; 275 (5304): 1320-1323.
- Boquet MP, Wonganan P, Dekker JD, Croyle MA. Influence of method of systemic administration of adenovirus on virus-mediated toxicity: focus on mortality, virus distribution, and drug metabolism, *J Pharmacol Toxicol Methods* 2008; 58(3): 222-232.
- Dewey RA, Morrissey G, Cowsill CM, Stone D, Bolognani F, Dodd NJ, Southgate TD, Klatzmann D, Lassmann H, Castro MG and Lowenstein PR. Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials, *Nat Med* 1999; 5: 1256-1263.
- Dormond E, Perrier M and Kamen A. From the first to the third generation adenoviral vector: What parameters are governing the production yield? *Biotechnol Advances* 2009; 27(2): 133-144.
- Driesse MJ, Vincent AJ, Sillevs Smitt PA, Kros JM, Hoogerbrugge PM, Avezaat CJ, Valerio D and Bout A. Intracerebral injection of adenovirus harboring the HSVtk gene combined with ganciclovir administration: toxicity study in nonhuman primates, *Gene Ther* 1998; 5: 1122-1129.
- Fechner H, Haack A, Wang H, Wang X, Eizema K, Pauschinger M, Schoemaker R, Veghel R, Houtsmuller A, Schultheiss HP, Lamers J and Poller W. Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers, *Gene Ther* 1999; 6: 1520-1535.
- Garcia-Banuelos J, Siller-Lopez F, Miranda A, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E and Armendariz-Borunda J. Cirrhotic rat livers with extensive fibrosis can be safely transduced with clinical-grade adenoviral vectors. Evidence of cirrhosis reversion, *Gene Ther* 2002; 9: 127-134.
- Gomez-Manzano C, Yung WK, Alemany R and Fueyo J. Genetically modified adenoviruses against gliomas: from bench to bedside, *Neurol* 2004; 63: 418-426.
- Krebs P, Scandella E, Odermatt B and Ludewig B. Rapid functional exhaustion and deletion of CTL following immunization with recombinant adenovirus, *J Immunol* 2005; 174: 4559-4566.
- Manickan E, Smith JS, Tian Jie, Eggerman TL, Lozier JN, Muller J and Byrnes AP. Rapid Kupffer cell death after intravenous injection of adenovirus vectors, *Mol Ther* 2006; 13(1): 108-117.
- Markus JV, Vähä-Koskela B, Heikkilä JE and Hinkkanen AE. Oncolytic viruses in cancer therapy, *Cancer Letters* 2007; 254(2): 178-216.
- Massari I, Donnini A, Argentati K, Straino S, Mangoni A, Gaetano C, Viticchi C, Capogrossi M and Provinciali M. Age-dependent effects of repeated immunization with a first generation adenovirus vector on the immune response and transgene expression in young and old rats,

- Exp Gerontol 2002; 37: 823-831.
- McConnell MJ and Imperiale MJ. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy, *Human Gene Ther* 2004; 15(11): 1022-1033.
- Morrissey RE, Horvath C, Snyder EA, Patrick J, Collins N, Evans E and MacDonald JS. Porcine toxicology studies of SCH 58500, an adenoviral vector for the p53 gene, *Toxicol Sciences* 2002a; 65(2): 256-265.
- Morrissey RE, Horvath C, Snyder EA, Patrick J and MacDonald JS. Rodent nonclinical safety evaluation studies of SCH 58500, an adenoviral vector for the p53 gene, *Toxicol Sciences* 2002b; 65(2): 266-275.
- Pearson S, Jia H and Kandachi K. China approves first gene therapy. *Nat Biotechnol* 2004; 22(1): 3-4.
- Raki M, Kanerva A, Ristimaki A, Desmond RA, Chen TD, 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* 2005; 12: 1198-1205.
- Raper SE, Yudkoff M, Chirmule N, Gao GP, Nunes F, Haskal ZJ, Furth EE, Probert KJ, Robinson MB, Magosin S, Simoes H, Speicher L, Hughes J, Tazelaar J, Wivel NA, Wilson JM and Batshaw ML. A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Human Gene Ther* 2002; 13(1): 163-175.
- Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao G, Wilson JM and Batshaw ML. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer, *Mol Genet Met* 2003; 80(1-2): 148-158.
- Raper SE. Gene therapy: The good, the bad, and the ugly, *Surgery* 2005; 137(5): 487-492.
- Su C, Cao H, Tan S, Huang Y, Jia X JL, Wang K, Chen Y, Long J, Liu X, Wu M, Wu X and Qian Q. Toxicology profiles of a novel p53-armed replication-competent oncolytic adenovirus in rodents, felids, and nonhuman primates, *Toxicol Sciences* 2008; 106(1): 242-250.
- Thomas CE, Birkett D, Anozie I, Castro MG and Lowenstein PR. Acute direct adenoviral vector cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain, *Mol Ther* 2001; 3(1): 36-46.
- Tripathy SK, Goldwasser MM, Lu EB and Leiden JM. Stable delivery of physiologic levels of recombinant erythropoietin to the systemic circulation by intramuscular injection of replication-defective adenovirus, *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11557-11561.
- Vlachaki MT, Hernandez-Garcia A, Ittmann M, Chhikara M, Aguilar LK, Zhu X, The BS, Butler EB, Woo S, Thompson TC, Barrera-Saldana H and Aguilar-Cordova E. Impact of preimmunization on adenoviral vector expression and toxicity in a subcutaneous mouse cancer model, *Mol Ther* 2002; 6: 342-348.
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA and Nemerow G. Integrins  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  promote adenovirus internalization but not virus attachment, *Cell* 1993; 73: 309-319.
- Zhang Y, Chirmule N, Gao GP, Qian R, Croyle M, Joshi B, Tazelaar J and Wilson JM. Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages, *Mol Ther* 2001; 3(51): 697-707.