

# 表达双功能融合蛋白(sCAR-EGF)腺病毒载体的构建及其活性检测 The Construction of Recombinant Adenovirus Expressing Bifunctional Fusion Protein sCAR-EGF and the Detection of its Activity

任鹏康<sup>1</sup>, 王 丰<sup>2</sup>, 李惠明<sup>2</sup>, 李宗海<sup>3</sup>, 黄 倩<sup>2\*</sup>

REN Peng-Kang<sup>1</sup>, WANG Feng<sup>2</sup>, LI Hui-Ming<sup>2</sup>, LI Zong-Hai<sup>3</sup> and HUANG Qian<sup>2\*</sup>

1 上海市第一人民医院中心实验室, 上海 200080;

2 上海交通大学附属第一人民医院中心实验室, 上海 200080

3 上海交通大学肿瘤研究所癌基因及相关基因研究国家重点实验室, 上海 200032

1 Central Experimental Laboratory, The First People's Hospital, Shanghai 200080, China

2 Central Experimental Laboratory, The First Affiliated People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China

3 State Laboratory for Oncogene and Related Gene Research, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China

**摘 要** 为了提高腺病毒载体用于基因治疗的靶向性, 采用 PCR 和体外连接的方法构建了柯萨奇病毒-腺病毒受体(Coxsackie virus-Adenovirus Receptor)胞外段 sCAR 和表皮生长因子(Epidermal growth factor)EGF 融合基因, 然后将此融合基因插入穿梭质粒 pDC315。利用 Ad-MAX 腺病毒系统, 将重组质粒 pDC315-sCAR-EGF 与腺病毒骨架质粒 pBHGloxΔE13cre 共同转染 AD-293 细胞, 成功包装出一种复制缺陷型腺病毒 Ad5-CMV-sCAR-EGF。经 PCR 鉴定该病毒含有 sCAR-EGF 融合基因片段, Western blotting 证实该病毒能表达 sCAR-EGF 融合蛋白。体外试验证实该病毒感染细胞所产生的融合蛋白能够引导携带报告基因的腺病毒 Ad5-CMV-luc 高水平感染肿瘤细胞, 为高水平表达 EGFR 的肿瘤的靶向性基因治疗提供了新的手段。

**关键词** 腺病毒, 表皮生长因子受体, 基因治疗, 柯萨奇病毒-腺病毒受体

中图分类号 Q81 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)05-0713-07

**Abstract** To improve the targeting of adenovirus vector for gene therapy, a fusion gene sCAR-EGF, in which epidermal growth factor gene was fused to the 3' end of extracellular Coxsackie virus-adenovirus receptor gene, was constructed and cloned into shuttle plasmid pDC315 to obtain a recombinant plasmid pDC315-sCAR-EGF. With the AdMax™ system, AD-293 cells were co-transfected with pDC315-sCAR-EGF and adenovirus genomic plasmid pBHGloxΔE13cre. Through high efficiency site specific recombination, a replication-defective adenovirus Ad5-CMV-sCAR-EGF was constructed. The recombinant adenovirus was analyzed by PCR and Western blotting, the results indicated that Ad5-CMV-sCAR-EGF contained the fusion gene sCAR-EGF, and the adenovirus infected cells was induced to produce and secrete the fusion protein into the supernatant. We have demonstrated that the fusion protein sCAR-EGF is helpful for elevating the infection efficiency of Ad5-CMV-luc with the reporter gene in vitro, which providing a new approach to the gene therapy for tumors overexpressing EGFR.

**Key words** adenovirus, epidermal growth factor receptor, gene therapy, Coxsackie virus-adenovirus receptor

Received: March 6, 2006; Accepted: May 12, 2006.

This work was supported by a grant National Science Foundation for Distinguished Young Scholars( No.30325043 )and Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development( No.2004CB518800 ).

\* Corresponding author. Tel 86-21-63240090-4601; E-mail huangq@online.sh.cn

国家自然科学基金杰出青年项目( No.30325043 )和国家 973 项目( No.2004CB518800 )微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

腺病毒载体已经广泛应用于肿瘤的基因治疗临床试验,腺病毒载体通过与细胞膜表面的柯萨奇病毒腺病毒受体(Coxsackie virus-Adenovirus Receptor, CAR)结合进入细胞,然而多数肿瘤细胞表面缺乏或低水平表达 CAR,使得腺病毒不能有效感染并发挥作用<sup>[1]</sup>。因此提高重组腺病毒载体对肿瘤细胞的感染效率,特别是靶向性感染肿瘤细胞,降低其对正常组织的损伤,已成为肿瘤基因治疗研究的热点<sup>[2]</sup>。靶向性可被划分为单组分靶向腺病毒载体和双组分靶向腺病毒载体。双组分腺病毒载体通过一个双功能分子和腺病毒一起联合发挥作用,借助双功能分子一方面阻断了病毒与天然受体的结合,同时又能引导病毒到达肿瘤细胞或组织。双组分系统的优势在于仅变换双功能分子便可靶向多种受体,不需要针对每一种受体对腺病毒载体进行基因改造,故具有更大的灵活性。

肿瘤细胞膜表面或肿瘤新生血管高水平表达抗原或受体都可以作为针对肿瘤的靶向导入目标<sup>[3]</sup>。表皮生长因子受体(EGFR)的异常高表达常见于肺癌、乳腺癌、结肠癌、肝癌、卵巢癌、膀胱癌、脑胶质瘤以及头颈部恶性肿瘤<sup>[4,5]</sup>等多种实体肿瘤,并与肿瘤细胞的恶性生物学行为以及肿瘤患者的不良预后密切相关。因此 EGFR 已成为相关肿瘤治疗研究的重要靶标<sup>[6]</sup>。为了高效介导携带治疗基因的腺病毒载体感染肿瘤细胞,我们构建了一端为腺病毒柯萨奇病毒受体胞外段 sCAR,另一端为表皮生长因子 EGF 的融合蛋白编码基因,并以腺病毒为载体,拟通过对肿瘤组织内部及其周围正常细胞的感染,使融合蛋白高水平表达,再通过融合蛋白的 sCAR 端与腺病毒的纤维蛋白的纤毛小结(knob)结合<sup>[7]</sup>,EGF 端与肿瘤细胞表面的 EGFR 结合,从而引导携带治疗基因的病毒选择性到达肿瘤细胞。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试剂:**腺病毒的构建及包装采用 Microbix Biosystems 公司的 AdMax™ 系统,腺病毒的穿梭质粒采用 pDC315,骨架载体采用 pBHGloxΔE13cre;EGF 表达质粒 phistone-EGF 由上海交通大学肿瘤研究所惠赠;限制酶,T4 连接酶为 TaKaRa 公司产品;TRIZOL RNA 抽提试剂盒,Lipofectamine 2000 转染试剂盒,胎牛血清及新生牛血清,DMEM 培养基,Opti-MEM 和 RPMI-1640 培养基为购自 Invitrogen 公司。CAR 的单克隆抗体(RmcB,05-644)购自 Upstate 公

司,EGF 的抗体(sc-275)购自 Santa Cruz 公司。HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(sc-2005)和山羊抗兔二抗(sc-2004)为 Santa Cruz 公司产品,逆转录试剂盒为 MBI Fermentas 公司产品。高保真 pfu 酶为 Stratagene 公司产品。人 EGF 定量 ELISA 检测试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司。Luciferase assay system 购自 Promega 公司。

**1.1.2 细胞株及病毒:**腺病毒包装细胞 AD-293 购自 Stratagene 公司,人肝癌细胞系 SMMC-7721,人视网膜母细胞瘤细胞系 HXO-Rb<sub>44</sub>,人慢性髓性粒细胞白血病细胞系 K-562,人肺癌细胞系 A549 等细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所中国科学院细胞库,人卵巢癌细胞系 SKOV-3 由上海交通大学肿瘤研究所惠赠。A549 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基培养。AD-293 细胞,SMMC-7721 和 SKOV-3 细胞均采用含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养基培养。HXO-Rb<sub>44</sub> 和 K-562 用含 10% 新生小牛血清的 RPMI-1640 培养基培养。表达 luciferase 的腺病毒 Ad5-CMV-luc 由本实验室构建并保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 全长和胞外段 CAR 编码基因的克隆:**采用 Trizol 抽取 AD-293 细胞的总 RNA,然后由 Fermentas 逆转录制备 cDNA。以此 cDNA 为模板分别用引物 fCAR-F: 5'-GGAATTCCCGCCTACCTGCAGCCG-3'(下划线为 EcoR I 切点)和 fCAR-R: 5'-GC TCTAGAGAGACATATGGAGGCTCTATAC-3'(下划线为 Xba I 切点)PCR 扩增全长的 CAR 的 cDNA,采用适当的限制性内切酶消化 PCR 产物后插入质粒 pcDNA3.1(+ )中,得到质粒 pcDNA3.1-fCAR。用引物 sCAR-F: 5'-GGAATTCCCGCCTACCTGCAGCCG-3'(下划线为 EcoR I 切点)和 sCAR-R: 5'-CGGGATCCAGCTTTATTTGAAGGAGGGACAAC-3'(下划线为 BamH I 切点)从质粒 pcDNA3.1-fCAR 中 PCR 扩增出编码 CAR 基因的胞外段 cDNA,产物经限制性内切酶消化后插入腺病毒穿梭质粒 pDC315 中得到重组质粒 pDC315-sCAR。进一步用 EcoR I, BamH I 酶切和测序进行鉴定。

**1.2.2 融合基因 sCAR-EGF 的克隆和鉴定:**采用引物 EGF-F: 5'-CGGGATCCGGTGGTGGCGTTCT AATTCCG-3'(下划线为 BamH I 切点)和 EGF-R: 5'-GACGCGTCTGACTCAACGCAGTTCACCATTTC-3'(下划线为 Sal I 切点)从 EGF 表达质粒 phistone-EGF 中 PCR 扩增出 EGF cDNA,经 BamH I 和 Sal I 双酶切后



## 2 结果

### 2.1 sCAR-EGF 融合基因的结构与测序结果

从 AD293 细胞抽提得到的 RNA 经过 RT-PCR 和 PCR 扩增得到的全长 CAR cDNA 约 1.2kb, 插入质粒 pcDNA3.1 后得到重组质粒 pcDNA3.1-fCAR, 经酶切和测序鉴定正确。

以质粒 pcDNA3.1-fCAR 为模板, PCR 得到编码 CAR 基因胞外段 sCAR 的 cDNA 长约 750bp。插入穿梭质粒 pDC315 后经酶切和测序鉴定正确。再以质粒 phistone-EGF 为模板 PCR 扩增出编码 EGF 的 cDNA 长约 180bp 插入到质粒 pDC315-sCAR, 得到重组质粒 pDC315-sCAR-EGF, 其中 sCAR 在上游, EGF 在下游, 两者之间由 *Bam*H I 切点连接 (如图 1)。图 2 显示该质粒经过 *Eco*R I, *Bam*H I 和 *Sal* I 联合酶切后得到 755bp 的 sCAR 片段和 184bp 的 EGF 片段 (泳道 2), 经过 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切后得到 938bp 的 sCAR-EGF 融合基因片段 (泳道 3), 经过 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切后得到 184bp 的 EGF 片段 (泳道 4)。其中切去插入片段后载体的大小与 pDC315 的大小一致 (泳道 2, 3 与 6)。对该重组质粒进行测序, 结果与设计完全相同, 两个基因的拼接处有一连接子编码多肽 GSGGGGS 片段, 无阅读框架移位, sCAR 片段和 EGF 片段也准确无误。

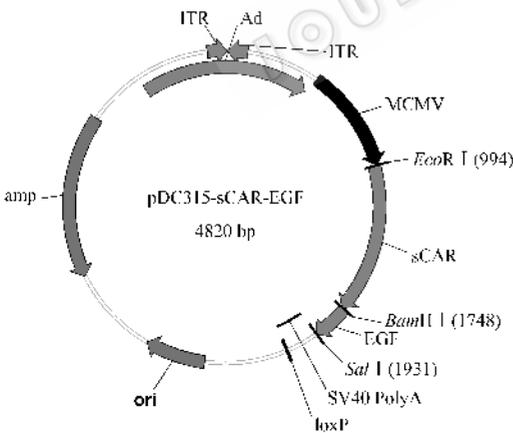


图 1 重组穿梭质粒 pDC315-sCAR-EGF 图谱

Fig. 1 The map of recombinant shuttle plasmid pDC315-sCAR-EGF

### 2.2 重组腺病毒表达融合蛋白

携带融合基因的重组穿梭质粒 pDC315-sCAR-EGF 和腺病毒骨架质粒 pBHGlox $\Delta$ E13cre 在脂质体 lipofectamine 2000 帮助下共转染 AD-293 包装细胞, 于转染后第 5d 经胰酶消化, 扩增至 10cm 培养盘中, 继续培养 1 周, 即可观察到局部细胞形态出现变圆

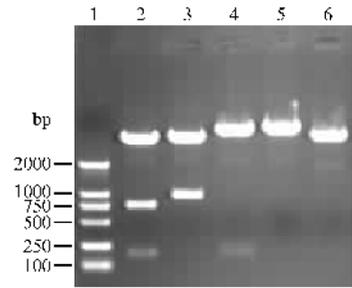


图 2 重组质粒 pDC315-sCAR-EGF 酶切鉴定图谱

Fig. 2 Enzyme digested electrophoresis map of recombinant plasmid pDC315-sCAR-EGF

1: DNA marker DL2000; 2: Digested with *Eco*R I, *Bam*H I and *Sal* I; 3: Digested with *Eco*R I and *Sal* I; 4: digested with *Bam*H I and *Sal* I; 5: digested with *Eco*R I; 6: plasmid pDC315 digested with *Eco*R I.

漂起, 随之形成典型的彗星状病变。待病变进一步扩大, 大部分细胞变圆漂起时, 收集细胞及其培养液, 反复冻融 3 次后, 作为原始病毒保存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。从中取出少量用病毒空斑法筛选三轮, 获得预定的毒株, 命名为 Ad5-CMV-sCAR-EGF。毒株的快速鉴定采用 PCR 方法, 详见材料和方法部分, 经病毒核酸提取试剂盒抽提得到病毒 DNA 为模板, 利用引物 pDC315F 和 pDC315R PCR 扩增, 得到的产物大小约为 1.1kb, 与理论推断大小相符 (755bp sCAR, 184bp EGF, linker 及其 pDC315 部分片段), 并与以阳性对照质粒 pDC315-sCAR-EGF 作为模板 PCR 扩增得到的片段大小完全一致 (见图 3), 证明包装出的病毒含有融合基因片段 sCAR-EGF。将经鉴定确认无误的病毒扩增后病毒用 TCID<sub>50</sub> 法测定其滴度为  $1.26 \times 10^9$  TCID<sub>50</sub>/mL, 如换算成 pfu 相当于  $2.5 \times 10^8$  pfu/mL。

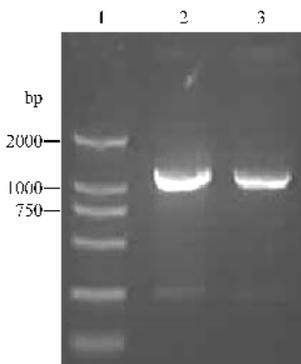


图 3 重组病毒的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR analysis of Ad5-CMV-sCAR-EGF

1: DNA markers DL2000; 2: PCR product product of plasmid pDC315-sCAR-EGF; 3: PCR product of Ad5-CMV-sCAR-EGF.

的外源基因是否表达。SMMC-7721 经 Ad5-CMV-sCAR-EGF 感染后,作 SDS-PAGE 电泳,然后转移到 NC 膜上,与抗 CAR 抗体杂交。未感染的 SMMC-7721 作为对照,两者在约 46kD 处均检测到一条带,即完整的 CAR 蛋白条带。此外经病毒 Ad5-CMV-sCAR-EGF 感染的 SMMC-7721 细胞还检测到一蛋白条带,分子量约 43kD,与预测的 CAR 胞外段和 EGF 的融合蛋白大小一致。此 NC 膜洗脱抗 CAR 的抗体后与抗 EGF 抗体(SC-275)杂交,经病毒 Ad5-CMV-sCAR-EGF 感染的 SMMC-7721 细胞在 43kD 处也检测到阳性信号。此外,经病毒 Ad5-CMV-sCAR-EGF 感染的 SMMC-7721 的细胞培养液经 Amicon ultra 10kD 超滤离心柱浓缩后的样品 Western blot 也检测到相同的结果,证明重组病毒 Ad5-CMV-sCAR-EGF 能够表达并分泌融合蛋白 sCAR-EGF。

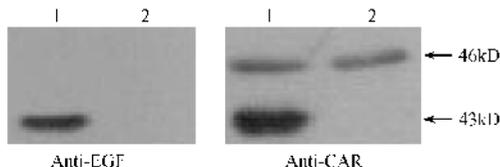


图4 融合蛋白 sCAR-EGF 的 western blot 图谱

Fig.4 Western blotting analysis of fusion protein sCAR-EGF

1 SMMC-7721 infected with Ad5-CMV-sCAR-EGF ; 2 : SMMC-7721.

我们还进一步采用 ELISA 方法检测经 Ad5-CMV-sCAR-EGF 感染的 SMMC-7721 细胞培养液中 EGF 含量的变化,被感染的细胞培养液中 EGF 的含量明显增加,达到了  $1.729\mu\text{g}/\text{mL}$ ,而未被病毒感染的细胞的培养液中 EGF 的含量仅为  $1.63\text{ng}/\text{mL}$ 。

### 2.3 融合蛋白显著提高腺病毒对肿瘤细胞的感染效率

收集经 Ad5-CMV-sCAR-EGF 感染的 SMMC-7721 细胞的培养液,取含  $0.75\mu\text{g}$ EGF 的细胞培养液与 Ad5-CMV-luc 室温孵育 30min 后,分别加入到培养 SKOV-3, A549, HXO-Rb<sub>44</sub> 和 K562 细胞的 24 孔培养板中,以仅加入病毒 Ad5-CMV-luc 感染的作为对照。90min 后更换为新鲜培养基,培养 48h 后裂解细胞检测荧光素酶活性。检测结果表明含有 sCAR-EGF 融合蛋白的可显著提高 Ad5-CMV-luc 对肿瘤细胞的感染效率,与单独感染病毒 Ad5-CMV-luc 的比较,SKOV-3 提高了 30.1 倍,A549 细胞提高了 9.3 倍,K562 细胞提高了 13.6 倍,HXO-RB<sub>44</sub> 细胞提高了 1.8 倍(如图 5)。

为了进一步证明 sCAR-EGF 融合蛋白能够提高腺病毒对肿瘤细胞的感染效率,在加入融合分子促

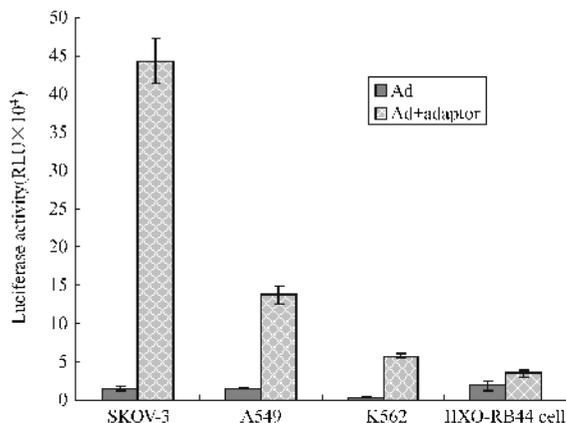


图5 sCAR-EGF 提高 Ad5-CMV-luc 对肿瘤细胞的感染效率  
Fig.5 Improving infection efficiency of Ad5-CMV-luc mediated by sCAR-EGF

进腺病毒 Ad5-CMV-luc 感染同时加入 EGFR 抗体和 CAR 抗体阻断,结果显示(图 6)EGFR 抗体能够有效阻断 sCAR-EGF 介导的腺病毒 Ad5-CMV-luc 感染,根据测得荧光素酶活性有明显下降,而 CAR 抗体的阻断作用不明显。

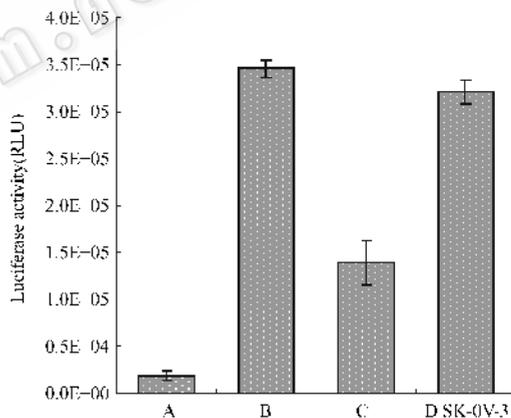


图6 抗体阻断对 sCAR-EGF 介导 Ad5-CMV-luc 感染 SKOV-3 细胞的影响

Fig.6 The effect of antibody blocking to the infection of Ad5-CMV-luc to SKOV-3 with sCAR-EGF

A : Ad5-CMV-luc ; B : Ad5-CMV-luc +  $0.5\mu\text{g}$  sCAR-EGF ; C : Ad5-CMV-luc +  $0.5\mu\text{g}$  sCAR-EGF + anti-EGFR ; D : Ad5-CMV-luc +  $0.5\mu\text{g}$  sCAR-EGF + anti-CAR.

### 3 讨论

在肿瘤的基因治疗研究中,腺病毒载体应用较多是因为其具有宿主范围广,能够感染不同组织学起源的肿瘤细胞,基因转移效率高,在体内能够介导外源基因高水平表达等优点。然而宿主宽广同时又是腺病毒载体用于肿瘤治疗的一个障碍,因为机体大部分正常组织细胞表面均存在 CAR,但是不同组

织细胞表面 CAR 的表达水平存在差异,特别是某些肿瘤细胞表面的 CAR 较相同的正常组织细胞减少<sup>[8,9]</sup>,因而腺病毒的感染缺乏特异性,且对不同组织细胞和恶性肿瘤的感染效率存在差异,尤其是在系统给药治疗肿瘤时,需要更大的给药剂量。与此同时,更多的腺病毒载体到达正常组织,将引起某些组织和器官更严重的损伤,或导致更严重的免疫反应。腺病毒载体的上述缺陷限制了其在实际工作中的应用。因此,腺病毒载体的靶向改造显得尤为重要。

双功能融合分子通过一端与腺病毒结合,另一端引导腺病毒载体与细胞表面特异抗原或受体结合,不仅减少或阻断了腺病毒与天然受体的结合,又能引导病毒到达新的靶组织或细胞。融合分子与病毒结合的一端可以是抗病毒纤毛小节的抗体<sup>[10]</sup>、CAR 的胞外部分<sup>[11]</sup>或者其他与腺病毒有高度亲和力的多肽;与靶细胞表面结合的一端可以是完整的抗体、抗体的一部分或者是能和膜表面受体结合的多肽或小分子化合物等。Beusechem 等人<sup>[12,13]</sup>一方面在腺病毒纤维蛋白及其基部的五邻体处造成突变,使腺病毒天然嗜性减弱;另一方面构建了一个由抗腺病毒单链抗体 S11 和抗 EGFR 抗体 scFv425 组成的融合分子 scFv425-S11,使得突变的腺病毒对于原代培养的神经胶质瘤细胞的感染效率提高 123 倍。在融合分子的作用下该病毒对于肿瘤组织和正常脑组织的感染比率较天然病毒提高了 5~38 倍之多,能够更有效的到达肿瘤组织而保护正常组织<sup>[14]</sup>。

我们根据大多数的实体瘤细胞 EGFR 表达上调的特点,构建了 sCAR-EGF 融合蛋白作为双功能分子,为了提高双功能分子的表达水平同时简化使用方法和途径,使用腺病毒作为载体。我们设想由于 sCAR-EGF 本身并无明显毒性,携带该基因的病毒可以感染肿瘤和周围正常组织细胞,sCAR-EGF 的表达可以介导其他携带细胞毒性基因的治疗性腺病毒载体选择性的感染肿瘤细胞。我们以荧光素酶作为报告基因的腺病毒的感染实验表明该双功能分子能够显著提高腺病毒对肿瘤细胞的感染效率和外源基因的表达水平。其效率与肿瘤细胞表面 EGFR 表达水平呈正相关,也与双功能分子的剂量存在明显的相关性,如 SKOV-3 细胞 luciferase 的活性提高了约 30 倍,这是因为 SKOV-3 细胞 CAR 的表达水平并不高,而 EGFR 表达水平很高<sup>[15]</sup>,融合分子的应用使细胞表面高水平的 EGFR 替代了细胞表面低水平的

CAR,可以与更多的腺病毒结合,引发病毒的内化和表达。不仅改变了腺病毒的天然嗜性,并且提高了感染效率。而 HXO-RB<sub>44</sub> 肿瘤细胞因为其 CAR 和 EGFR 的表达水平都很低,因而,应用融合分子后,腺病毒感染效率虽然有所提高,但变化幅度并不大。应用 EGFR 抗体能够较大幅度融合分子介导的腺病毒对肿瘤细胞的感染效率,而应用 CAR 抗体的阻断作用则不明显,说明腺病毒的感染不再依赖于细胞表面 CAR-fiber 的结合,而由 EGFR 的表达决定。

我们的初步实验结果表明,重组复制缺陷型腺病毒 Ad5-CMV-sCAR-EGF,感染细胞后能够表达融合蛋白 sCAR-EGF,该融合蛋白为分泌型蛋白,能够引导病毒到达靶细胞,提高腺病毒对靶细胞的转导效率,从而为靶向基因治疗策略的深入研究打下了基础。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] McConnell MJ, Imperiale MJ. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Human Gene Therapy*, 2004, **15**(11):1022-1033
- [2] Mizuguchi H, Hayakawa T. Targeted adenovirus vectors. *Human Gene Therapy*, 2004, **15**(11):1034-1044
- [3] Hanawa M, Suzuki S, Dobashi Y et al. EGFR protein overexpression and gene amplification in squamous cell carcinomas of the esophagus. *International Journal of Cancer*, 2006, **118**(5):1173-1180
- [4] Psyri A, Kassam M, Yu Z. Effect of epidermal growth factor receptor expression level on survival in patients with epithelial ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 2005, **11**(24):8637-8643
- [5] Quintela I, Corte MD, Allende MT et al. Expression and prognostic value of EGFR in invasive breast cancer. *Oncology Reports*, 2005, **14**(6):1655-1663
- [6] Lal A, Glazer CA, Martinson HM et al. Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Research*, 2002, **62**(12):3335-3340
- [7] Roelvink PW, Mi Lee G, Einfeld DA et al. Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenovirus. *Science*, 1999, **86**(5444):1568-1571
- [8] Kim M, Zinn KR, Barnett BG, Sumerel LA et al. The therapeutic efficacy of adenoviral vectors for cancer gene therapy is limited by a low level of primary adenovirus receptors on tumour cells. *European Journal of Cancer Prevention*, 2002, **38**(14):1917-1926
- [9] Rauen KA, Sudilovsky D, Le JL et al. Expression of the coxsackie adenovirus receptor in normal prostate and in primary and metastatic prostate carcinoma: potential relevance to gene therapy. *Cancer Research*, 2002, **62**(13):3812-3818
- [10] Miller CR, Buchsbaum DJ, Reynolds PN et al. Differential susceptibility of primary and metastatic human glioma cells to

- adenovirus infection : targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Research* , 1998 **58**( 24 ) 5738 – 5748
- [ 11 ] Excoffon KJ , Traver GL , Zabner J *et al.* The role of the extracellular domain in the biology of the coxsackievirus and adenovirus receptor. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* , 2005 **32**( 6 ) 498 – 503
- [ 12 ] Victor W. van Beusechem , Jacques Grill. Efficient and selective gene transfer into primary human brain tumors by using single-chain antibody-targeted adenoviral vectors with native tropism abolished. *Journal of Virology* , 2002 , **76**( 6 ) 2753 – 2762
- [ 13 ] Haisma HJ , Grill J , Curiel DT *et al.* Targeting of adenoviral vectors through a bispecific single-chain antibody. *Cancer Gene Therapy* , 2000 **7**( 6 ) 901 – 904
- [ 14 ] Oosterhoff D , Overmeer RM , van Beusechem VW. Adenoviral vector-mediated expression of a gene encoding secreted , EpCAM-targeted carboxylesterase-2 sensitises colon cancer spheroids to CPT-1. *British Journal of Cancer* , 2005 **92**( 5 ) 882 – 887
- [ 15 ] Hughes DP , Thomas DG , Giordano TJ *et al.* Cell surface expression of epidermal growth factor receptor and Her-2 with nuclear expression of Her-4 in primary osteosarcoma. *Cancer Research* , 2004 **64**( 6 ) 2047 – 2053