

B.A. Hadaschik^{1,2} · K. Zhang¹ · A.I. So¹ · J.C. Bell³ · J.W. Thüroff² · P.S. Rennie¹ · M.E. Gleave¹

¹ Prostate Centre, Vancouver General Hospital, Vancouver

² Urologische Klinik, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

³ Centre for Cancer Therapeutics, Ottawa Health Research Institute, Ottawa

Intravesikale Therapie nicht muskelinvasiver Blasen-tumoren mit onkolytischen Vesikular-Stomatitisviren

Das Harnblasenkarzinom ist nach dem Prostatakarzinom der zweithäufigste Tumor im Urogenitaltrakt und macht bei Männern etwa 8% und bei Frauen 3% aller bösartigen Neubildungen aus [6]. Im Rahmen der Erstdiagnose sind ca. 75% aller Blasenkarzinome nicht muskelinvasiv [9].

Niedrigrisikotumoren, welche den Großteil aller Läsionen ausmachen, bedürfen nach transurethraler Resektion und perioperativer Gabe von Mitomycin C lediglich einer engmaschigen Nachkontrolle, weil deren Rezidivfrequenz zwar hoch ist, aber eine Progression zu höheren Tumorstadien selten vorkommt [25]. Bei Tumoren mittleren Risikos sollte zusätzlich nach ca. 2–6 Wochen eine Nachresektion und adjuvante Mitomycin-C-Therapie erfolgen und im Falle von Hochrisikotumoren empfiehlt sich 2–3 Wochen nach der 2. Resektion der Beginn einer intravesikalen Immuntherapie mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG).

BCG ist ein abgeschwächter Stamm von Mycobacterium bovis und führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion der Blase, welche einen antikanzerogenen Effekt hat und neben einer Verringerung der Rezidivrate wahrscheinlich auch den gefährlicheren Tumorprogress verlangsamt [10, 24]. Aggressive Tumoren, die sich trotz dieser Therapie innerhalb kurzer Zeit weiterentwickeln, sollten in der Regel radikal mittels Zystektomie und Harnableitung saniert werden [12].

Als Second-line-Therapie für diejenigen Patienten, die trotz BCG kurzfristig Rückfälle erleiden oder BCG-resistente Tumoren haben, aber entweder eine radikale Zystektomie ablehnen oder diese große Operation nicht tolerieren, besteht die Möglichkeit, BCG mit der Gabe von Interferon zu kombinieren [14]. Die Heilungsaussichten unter dieser Therapie sind allerdings nur gering, weil insbesondere sehr aggressive Tumoren eine hohe Resistenz gegenüber einer Behandlung mit Interferon aufweisen [2, 16, 19]. Solch eine Eigenschaft verleiht den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil gegenüber normalem Gewebe und macht sie bis zu einem gewissen Grad für die immunologische Tumorabwehr „unsichtbar“, aber gleichzeitig beeinträchtigt es ihre Fähigkeit, auf virale Infektionen zu reagieren [5, 22]. Um nun eben diesen „wunden Punkt“ hochmaligner Blasenkrebszellen besser zu charakterisieren und therapeutisch aus-

zunutzen, haben wir verschiedene Blasentumorzelllinien mit neuartigen onkolytischen Viren behandelt, welche gezielt diejenigen Tumoren angreifen, deren Interferonsignaltransduktionswege defekt sind [8].

Vesikular-Stomatitisviren

Onkolytische Viren i. Allg. werden speziell konstruiert oder dahingehend ausgesucht, genetische Unzulänglichkeiten von Tumorzellen gezielt auszunutzen, wodurch eine hohe Spezifität gewährleistet wird [17]. Im Gegensatz zur konventionellen Gentherapie, in der Viren nur als Vektoren für eine gezielte „Genzustellung“ verwendet werden [2, 15], sind onkolytische Viren replikationskompetent, d. h. in der Lage, sich zu vermehren. Innerhalb von infizierten Tumorzellen (nicht in normalem Gewebe) werden so lange virale Partikel produziert, bis die Zelle platzt und dadurch mehr infektiöse Viren freigesetzt werden. Theoretisch vermehren sich onkolytische Viren aktiv im Tumorgewebe, bis dieses vollständig beseitigt ist. In den letzten Jahren ist eine Vielzahl verschiedener onkolytischer Viren beschrieben worden, die unterschiedlichste Defekte in Krebszellen ausbeuten [17]. Von diesen wiederum sind einige auch als intravesikale Agenzien getestet worden [4, 11, 20].

Abkürzungen	
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BLI	Biolumineszenzbildgebung
VSV	Vesikular-Stomatitisvirus
IFN	Interferon
pfu	plaqueformende Einheiten
ph/s	Photonen pro Sekunde
WT	Wildtyp

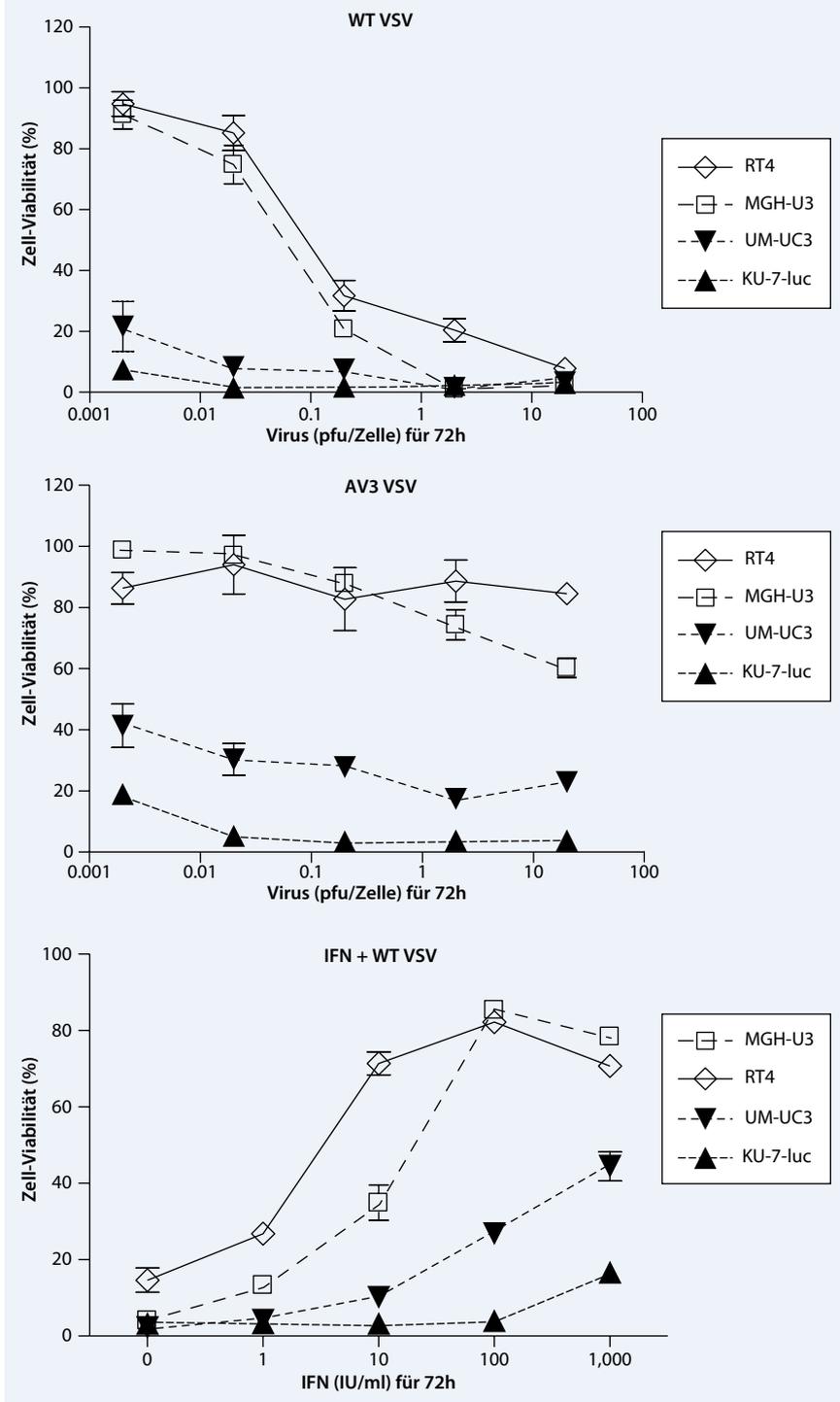


Abb. 1 ▲ Antitumoraktivität von Wildtyp-VSV (WT-VSV) und der attenuierten Variante AV3 gegenüber verschiedenen Blasen-tumorzelllinien, sowie Schutz derselben vor einer WT-VSV-Infektion durch vorherige Interferongabe (Mit Genehmigung aus [8])

Im Unterschied zu den bislang untersuchten Viren bieten die von uns verwendeten Vesikular-Stomatitisviren (VSV) sowohl einen einzigartigen Wirkmechanismus, der darauf beruht, dass sich die ausgesprochen Interferon-sensiblen Viren v. a. in Interferon-resistenten Zellen ver-

mehren, als auch eine sehr hohe Infektionseffizienz, die den Einsatz spezieller transduktionsverstärkender Reagenzien überflüssig macht [22]. VSV sind RNA-Viren der Familie der Rhabdoviridae und führen bei Huftieren zu einer Mundschleimhautentzündung mit Bläschenbil-

dung, welche der Maul- und Klauenseuche ähnelt und insbesondere in der Karibik auftritt.

Die intrinsische Tumorzellspezifität von VSV wurde von der Gruppe um Prof. Dr. John Bell am „Centre for Cancer Therapeutics“ in Ottawa in einem genetisch veränderten Subtyp von VSV (AV₃) weiter gesteigert, indem diese Virusvariante die für normales Gewebe protektiv wirkende endogene Bildung von Interferon fördert, anstatt sie wie der Wildtypvirus zu blockieren [23]. Interferone sind körpereigene Proteine, die v. a. antivirale, aber auch immunstimulierende und antitumorale Wirkungen entfalten [21]. Das von AV₃-VSV stimulierte und auch in der oben genannten intravesikalen Interferon-Therapie eingesetzte Typ-I-Interferon aktiviert umliegende virusinfizierte sowie nicht infizierte Zellen und regt in diesen die Expression von „Interferon-stimulierten Genen“ an. Dadurch werden in den Zellen verschiedene Proteine gebildet, welche einerseits eine weitere (Virus-) Proteinsynthese hemmen und andererseits einen Abbau viraler RNA bewirken. Die antitumorale Wirksamkeit der Typ-I-Interferone beruht zum einen auf ihrer antiproliferativen Wirkung und zum anderen auf einer Aktivierung von Immunzellen, die Tumorzellen als Fremdgewebe erkennen und töten [5].

Basierend auf vorangegangenen Studien mit Wildtyp-VSV und der noch tumorselektiveren Variante AV₃ in anderen Tumormodellen, in denen sowohl intratumorale Injektionen als auch eine systemische Gabe von VSV erfolgreich getestet wurden [1, 22, 23], haben wir erstmals die Wirksamkeit von VSV als intravesikale Instillationstherapie untersucht [8]. Eine intravesikale Administration bietet deutliche Vorteile gegenüber der systemischen Gabe von Viren, da weder zirkulierende Antikörper und Komplementproteine noch Leber und Milz die Viruseffizienz beeinträchtigen [18].

In vitro wurden zunächst 4 unterschiedlich aggressiv wachsende Blasen-tumorzelllinien dem Wildtypvirus oder der gentechnisch modifizierten Variante AV₃ ausgesetzt, um deren antiproliferative Wirkung zu testen (■ **Abb. 1** oben, Mitte). Während RT₄- und MGH-U₃-Zellen aus hoch differenzierten papillären

Blasentumoren gewonnen wurden, sind UM-UC3- und KU-7-Zellen weitgehend entdifferenziert. Sowohl Wildtyp-VSV als auch der attenuierte Stamm AV3 konnten das Wachstum der 2 aggressiven Zelllinien (UM-UC3, KU-7-luc) schon in sehr niedriger Dosierung stoppen. RT4- und MGH-U3-Zellen jedoch reagierten weniger sensibel auf eine Infektion mit dem Wildtypen und waren insbesondere AV3 gegenüber nahezu unempfindlich.

Dieser Unterschied zwischen den einzelnen Zelllinien beruht am ehesten darauf, dass RT4- und MGH-U3-Zellen noch Interferon-sensibel sind und intakte Interferon-signaltransduktionswege besitzen. Dies ließ sich u. a. dadurch bestätigen, dass diese Zellen nach exogener Zufuhr von Interferon langsamer wuchsen [8]. Außerdem konnten wir demonstrieren, dass UM-UC3- und KU-7-Zellen durch eine exogene Zugabe von Typ-I-Interferon schlechter vor einer tödlichen Wildtyp-VSV-Infektion (20 pfu/Zelle) zu bewahren waren als die beiden anderen Zelllinien (■ **Abb. 1** unten). Da AV3 eine endogene Interferonproduktion anregt, kann der hierdurch hervorgerufene antivirale Schutz erklären, warum normale Zellen wie auch gut differenzierte Tumorzelllinien vor den zytotoxischen Effekten von AV3 gefeit sind (■ **Abb. 1** Mitte).

Orthotopes Blasentumorwachstum in der Maus

Tierexperimentelle Studien wurden anschließend in einem von uns kürzlich validierten orthotopen Blasentumormausmodell durchgeführt [7]. Die technischen Möglichkeiten der Bildgebung kleiner Tiere haben sich in den letzten Jahren erheblich verbessert [13]. Neben Fortschritten z. B. in der Ultraschall-, Röntgen- und Kernspinttechnik erlauben auch auf Biolumineszenz basierende Verfahren, Tumorstadium longitudinal im lebenden Tier zu verfolgen.

In der Natur tritt Biolumineszenz bei Tiefseeorganismen oder auch bei Käfern wie dem Glühwürmchen auf. Im Rahmen von Laborexperimenten benötigen Biolumineszenzsysteme im Gegensatz zur Fluoreszenz die Zugabe eines Substrates (Luziferin), welches von vitalen Zellen, die das Enzym Luziferase exprimieren, ATP-ab-

Urologe 2008 · 47:1145–1151 DOI 10.1007/s00120-008-1827-x
© Springer Medizin Verlag 2008

B.A. Hadaschik · K. Zhang · A.I. So · J.C. Bell · J.W. Thüroff · P.S. Rennie · M.E. Gleave Intravesikale Therapie nicht muskelinvasiver Blasentumoren mit onkolytischen Vesikular-Stomatitisviren

Zusammenfassung

Patienten mit Hochrisikoblasentumoren, die nicht auf eine BCG-Immuntherapie ansprechen, stellen eine therapeutische Herausforderung dar. Als Second-line-Therapie wird derzeit häufig eine Kombination aus BCG plus Interferon empfohlen. Da jedoch ein Großteil aggressiv wachsender Tumoren nicht sensibel auf Interferon reagiert, käme anstatt dessen der Einsatz onkolytischer Vesikular-Stomatitisviren (VSV) in Betracht, die speziell Interferon-refraktäre Tumorzellen angreifen. In vitro töteten sowohl Wildtyp-VSV als auch ein attenuierter Subtyp, der eine gesteigerte Tumorselektivität aufweist, bevorzugt aggressiv wachsende, Interferon-resistente Blasen-tumorzellen. Anschließend In-vivo-Versuche

in einem von uns validierten orthotopen Mausmodell konnten die viel versprechende antikanzerogene Aktivität beider Viren nach intravesikaler Gabe eindrucksvoll bestätigen. Obwohl in diesem Modell immunkompromittierte Nacktmäuse verwendet werden, zeigte sich keine virale Toxizität. Zusammenfassend scheinen frühe klinische Studien zur intravesikalischen Therapie mit VSV gerechtfertigt.

Schlüsselwörter

Blasenkarzinom · Biolumineszenzbildgebung · Vesikular-Stomatitisviren · Intravesikale Therapie · Orthotopes Tiermodell

Oncolytic vesicular stomatitis viruses as intravesical agents against non-muscle-invasive bladder cancer

Abstract

Patients with high-risk bladder cancer who do not respond to bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy represent a significant therapeutic challenge. The addition of interferon to BCG has recently evolved as a second-line treatment option; however, many high-grade tumors are nonresponsive to interferon. Thus, replication-competent oncolytic vesicular stomatitis viruses (VSV) that selectively target interferon-refractory tumors are promising intravesical agents. In vitro, wild-type VSV as well as a mutant variant (AV3) that has an impaired ability to shut down innate immunity preferentially killed undifferentiated, interferon-nonresponsive bladder cancer cells. Testing of these viruses in an orthotopic murine model of high-

grade bladder cancer, which we have recently validated, revealed that both AV3 and wild-type VSV significantly inhibited orthotopic tumor growth. Despite the use of immunocompromised nude mice, there was no evidence of toxicity. In conclusion, VSV instillation therapy demonstrated strong antitumor activity and safety in an orthotopic model of high-risk disease. These findings provide preclinical proof-of-principle for the intravesical use of VSV, especially in interferon-refractory patients.

Keywords

Bladder cancer · Bioluminescence imaging · Vesicular stomatitis virus · Intravesical therapy · Orthotopic animal model

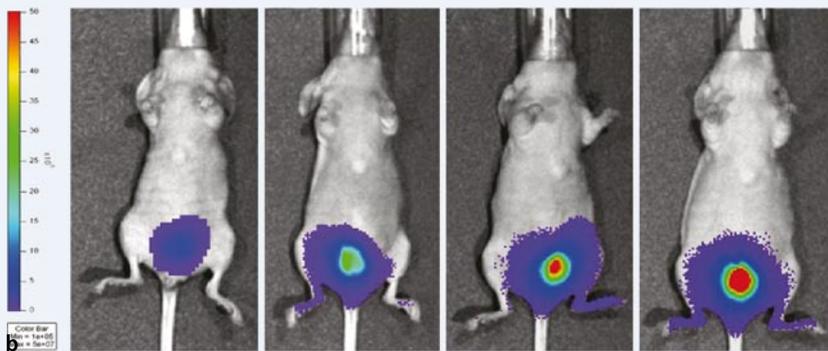
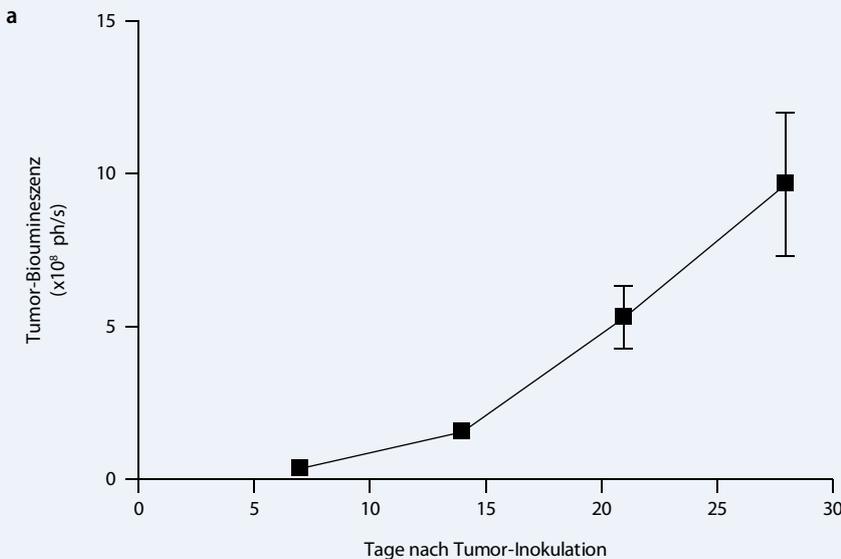
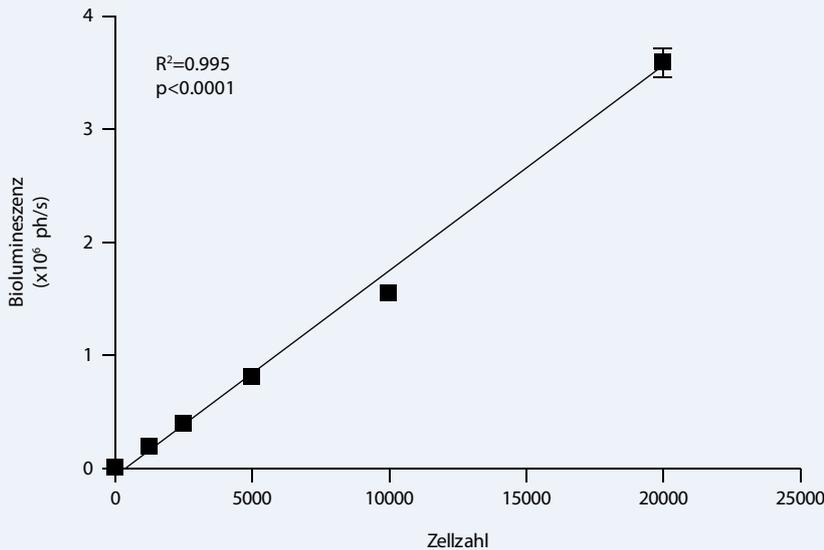
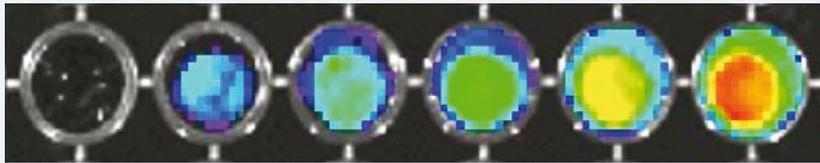


Abb. 2 ▲ **a, b** In-vitro-Biolumineszenz von KU-7-luc-Tumorzellen und deren In-vivo-Wachstum als orthotop Blasentumorxenografts (Mit Genehmigung aus [7])

hängig oxydiert wird. Hierbei kommt es zur kalten Emission von Photonen, die mit Hilfe hochempfindlicher Detektoren quantifiziert werden können. Der Nachteil der Variabilität, die durch die Verwendung eines Substrates entsteht, wird dadurch ausgeglichen, dass sich durch Biolumineszenz erzeugtes Licht besser vom Hintergrund des Tieres abhebt als Fluoreszenzsignale.

Basierend auf Vorarbeiten am „MD Anderson Cancer Center“ (Houston, TX) haben wir in Kooperation mit der dortigen Urologie ein lumineszierendes Blasen-tumormodell in der Maus beschrieben [7, 27]. Um in diesem System neue Therapieoptionen an menschlichen Tumorzellen testen zu können, wurden zunächst humane KU-7-Blasentumorzellen mittels eines Lentivirus infiziert, um stabil Luziferase zu exprimieren. Nach Zugabe von Luziferin emittieren diese Zellen (KU-7-luc) proportional zu ihrer Anzahl Licht (**Abb. 2a**). KU-7-luc-Blasentumorzellen wachsen sehr schnell und invasiv und bieten den Vorteil, dass sie als bislang einzige humane Zellart nach intravesikaler Instillation in athymische Nacktmäuse auch dann verlässlich in der Blase anheften, wenn das Urothel nicht zuvor chemisch oder elektrisch verletzt wurde. Vier Tage nach der initialen Tumorinokulation können die nun angewachsenen KU-7-luc-Tumorzellen unter Narkose mittels Biolumineszenzbildgebung erfasst werden.

Im Anschluss an die Randomisierung der Tiere in verschiedene Therapiearme wird das Tumorwachstum in der Regel alle 4–7 Tage erneut quantifiziert (**Abb. 2b**). Nach ungefähr 1 Monat beginnen die meist multifokal wachsenden KU-7-luc-Tumoren, die *Muscularis propria* zu infiltrieren, sodass es zu metastatischen Absiedlungen und/oder Harnstau kommen kann. Da solch invasives Wachstum systemischer Therapie bedürfte, beenden wir unsere Versuchsreihen im Schnitt nach 3–4 Wochen.

Auf die Optimierung unseres Tumormodells folgte dessen Validierung durch Vergleichen der Biolumineszenzmesswerte sowohl mit histopathologischen Tumolvolumina als auch mit MRT-Daten (**Abb. 3a**). Hierzu wurden die Mäuseblasen in toto exzidiert und in einem spe-

ziellen 7-Tesla-Kleintier-MRT-Scanner (Bruker, Karlsruhe) in 3 Ebenen untersucht, um das Gesamttumorvolumen anhand der Fläche auf den einzelnen Schnitten zu berechnen. Weil keine narkotisierten Mäuse, sondern nur deren Blasen gescannt wurden, konnten Bewegungsartefakte vermieden und eine sehr hohe Auflösung ermöglicht werden. Im Anschluss wurden die Präparate in Paraffin eingebettet und 5 µm starke Schnitte des gesamten Blockes einer jeden Blase angefertigt, welche wiederum im Hinblick auf die Tumorfläche manuell am Computer vermessen wurden.

Sowohl die MRT-Tumorvolumina als auch die Volumina im histologischen Präparat korrelierten exzellent mit den Biolumineszenzmessungen (■ Abb. 3b, c), sodass hiermit erstmals ein validiertes orthotopes Blasentumormodell geschaffen wurde, welches eine unkomplizierte longitudinale Beobachtung von Behandlungseffekten in der lebenden Maus mittels Biolumineszenz ermöglicht [7].

Onkolytische Viren als intravesikale Therapeutika

Um die antikanzerogene Potenz der beiden von uns ausgewählten VSV-Stämme zu testen, wurden insgesamt 3 Gruppen von Mäusen mit jeweils einem der beiden Viren oder mit durch UV-Bestrahlung inaktivierten Viren intravesikal behandelt (■ Abb. 4). Die Instillationen erfolgten hierbei an den Tagen 4, 9 und 14 nach der KU-7-luc-Tumorinokulation. Drei Wochen später wurden zwei Drittel aller Mäuse getötet, um deren Blasen histologisch zu untersuchen und gleichzeitig eine systemische Replikation von Viren auszuschließen [8]. Die verbliebenen Tiere wurden weitere 3 Monate regelmäßig untersucht, damit weder eine Langzeittoxizität der viralen Therapie noch Tumorrezidive übersehen wurden. Verglichen mit der Kontrollgruppe verlangsamten sowohl der Wildtyp als auch AV3-VSV das Tumorstadium deutlich (■ Abb. 4). Am Ende der Studie betrug die Tumorbiolumineszenz in der Wildtypgruppe 2% und in den mit AV3 behandelten Mäusen 10% des Durchschnittswertes der Tiere, denen abgetötete Viren instilliert worden waren.

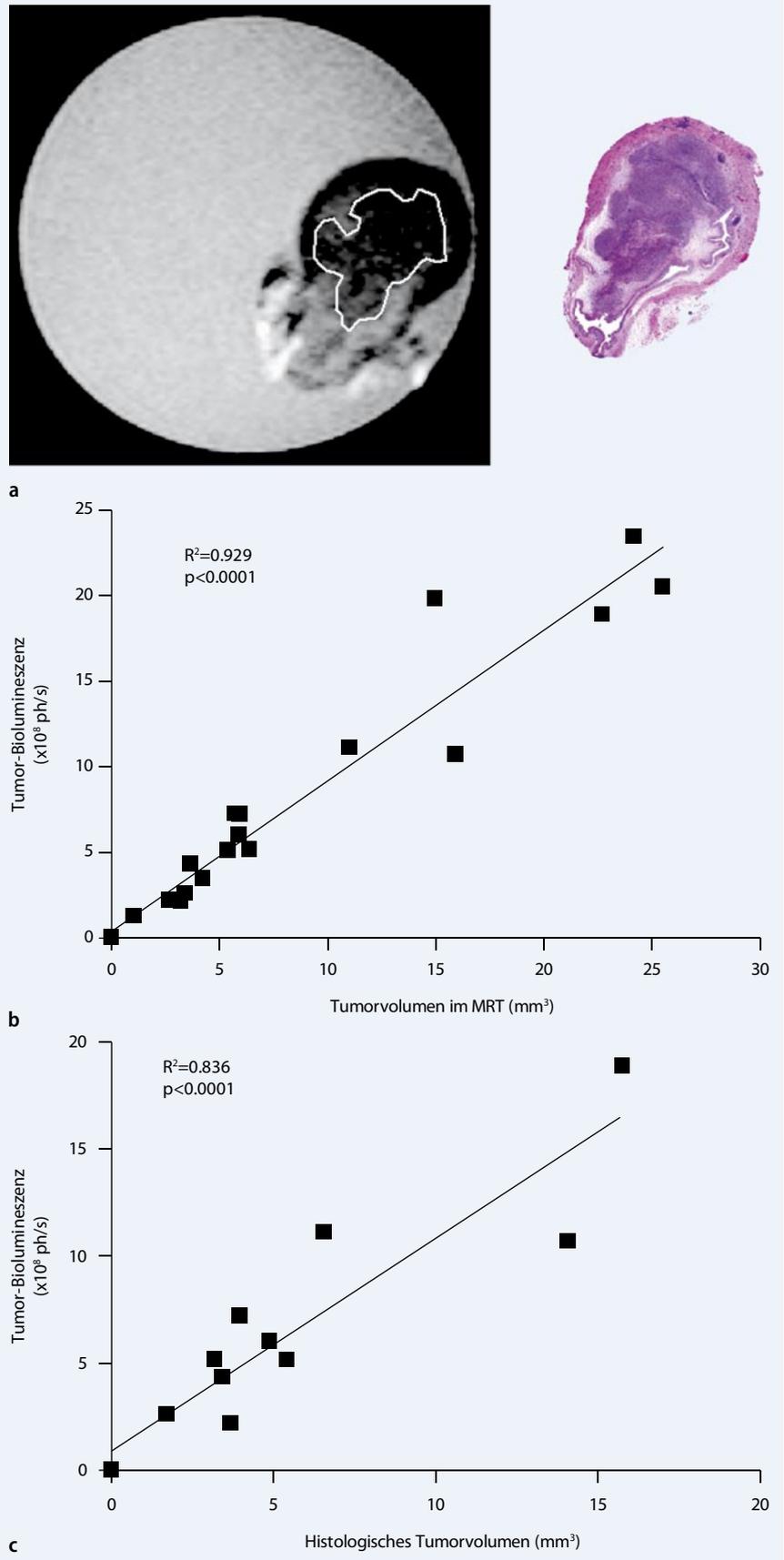


Abb. 3 ▲ a–c Korrelation von Biolumineszenzmessungen mit Tumorvolumina im MRT und histologischen Präparat (Mit Genehmigung aus [7])

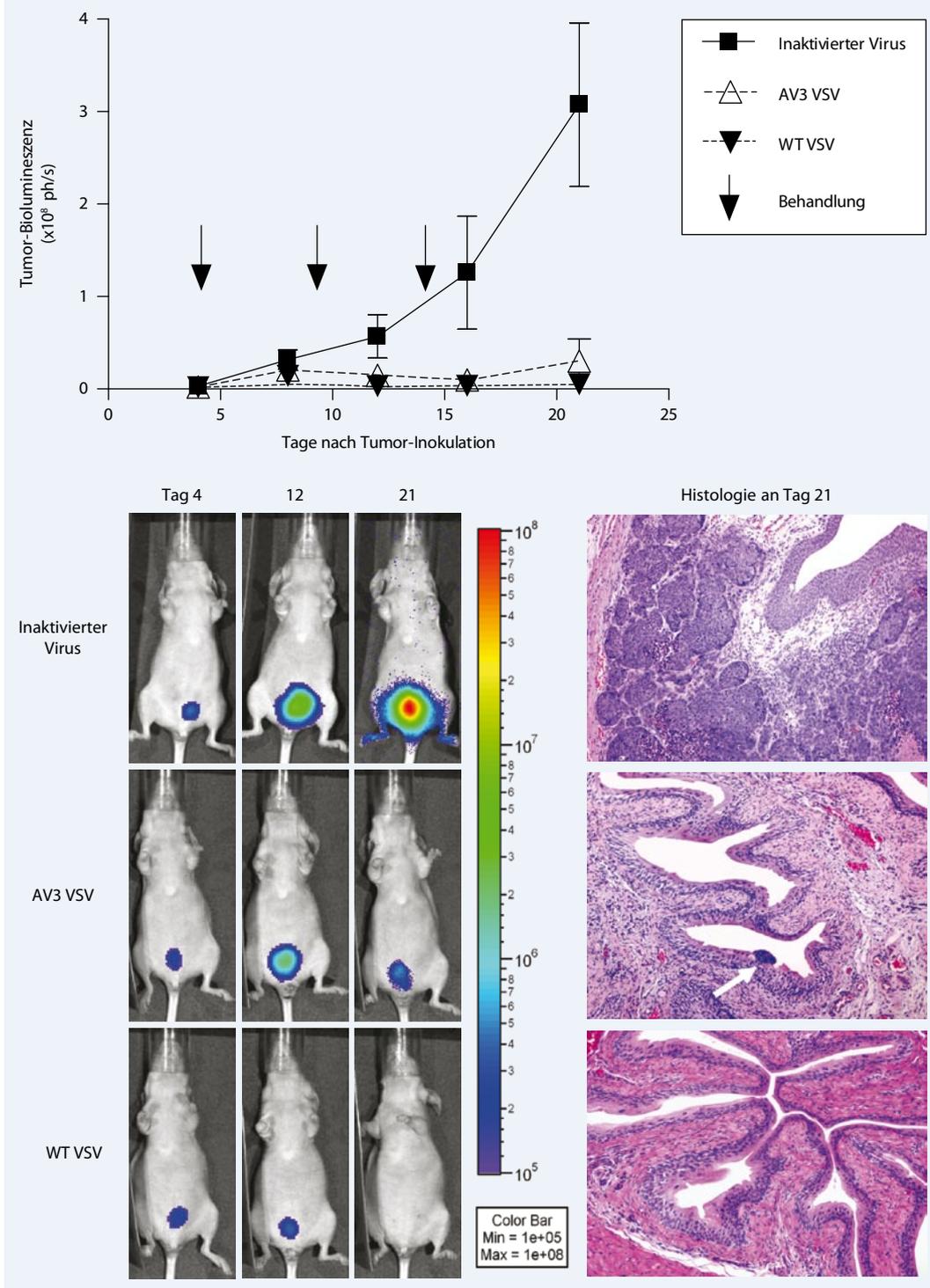


Abb. 4 ◀ Intravesikale Therapie orthotoper KU-7-luc-Blasentumoren mit Wildtyp-VSV und AV3 (Mit Genehmigung aus [8])

Obwohl in unserem Tumormodell immunkompromittierte Nacktmäuse verwendet werden, traten erstaunlicherweise in beiden Verumbehandlungsarmen über den gesamten Beobachtungszeitraum keine systemischen Nebenwirkungen der intravesikalen Virusgabe auf. Thymusaplastische Nacktmäuse können virale Infekte an sich nur unzureichend bekämpfen und

sterben innerhalb kurzer Zeit nach einer systemischen Infektion mit Wildtyp-VSV [23]. Der attenuierte Subtyp AV3 dagegen wird gut vertragen, weil er sich aufgrund der viral induzierten Interferonproduktion superselektiv vermehrt [23]. Da VSV neben seiner direkten onkolytischen Wirkung auch eine starke tumorhemmende Immunantwort auslösen kann [3] und be-

reits in zahlreichen syngen Tumormodellen erfolgreich getestet wurde [26], ist es wahrscheinlich, dass eine intravesikale Therapie mit VSV auch in immunkompetenten Tiermodellen bzw. im Menschen wirksam sein wird.

Fazit für die Praxis

Patienten, deren Hochrisikoblastentumoren nicht auf eine BCG-Immuntherapie ansprechen, stellen eine große therapeutische Herausforderung dar. Neben einer Zystektomie oder optimierter Chemotherapie wird heutzutage häufig eine Kombination aus BCG plus Interferon empfohlen. Da jedoch ein Großteil aggressiv wachsender Tumoren nicht sensibel auf Interferon reagiert, käme anstatt dessen der Einsatz onkolytischer Viren in Betracht, die gezielt Interferon-refraktäre Tumorzellen töten. In präklinischen Studien wurde deren viel versprechende antikanzerogene Aktivität sowohl nach systemischer als auch intravesikaler Gabe eindrucksvoll demonstriert. Das von uns validierte, auf Biolumineszenz basierende orthotope Blasen-tormodell bietet urologischen Forschergruppen die Möglichkeit, verschiedenste Therapien an humanen Ta/T1-Blasentumoren effizient und unter geringem Einsatz von Versuchstieren zu testen. Mit Hilfe dieses Systems und neuartiger Therapieansätze werden Blasen-tumorpatienten in Zukunft hoffentlich mehr und wirksamere intravesikale Therapien angeboten werden können, sodass die Rezidivhäufigkeit und der Progress von nicht muskelinvasiven Tumoren sinken.

Korrespondenzadresse

Dr. B.A. Hadaschik



Urologische Klinik, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz
boris.hadaschik@gmx.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor weist auf folgende Beziehung hin: John Bell ist Mitbegründer von Jennerex Biotherapeutics, San Francisco, CA, einer Firma, die onkolytische Vaccinia-Viren entwickelt. Es besteht kein Interessenkonflikt. Der Beitrag ist unabhängig und produktneutral.

Literatur

1. Ahmed M, Cramer SD, Lyles DS (2004) Sensitivity of prostate tumors to wild type and M protein mutant vesicular stomatitis viruses. *Virology* 330: 34–49
2. Benedict WF, Tao Z, Kim CS et al. (2004) Intravesical Ad-IFNalpha causes marked regression of human bladder cancer growing orthotopically in nude mice and overcomes resistance to IFN-alpha protein. *Mol Ther* 10: 525–532
3. Breitbach CJ, Paterson JM, Lemay CG et al. (2007) Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow. *Mol Ther* 15: 1686–1693
4. Cozzi PJ, Malhotra S, McAuliffe P et al. (2001) Intravesical oncolytic viral therapy using attenuated, replication-competent herpes simplex viruses G207 and Nu1020 is effective in the treatment of bladder cancer in an orthotopic syngeneic model. *FASEB J* 15: 1306–1308
5. Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC et al. (2005) A critical function for type I interferons in cancer immunoeediting. *Nat Immunol* 6: 722–729
6. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (2006) Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends 80–83
7. Hadaschik BA, Black PC, Sea JC et al. (2007) A validated mouse model for orthotopic bladder cancer using transurethral tumour inoculation and bioluminescence imaging. *BJU Int* 100: 1377–1384
8. Hadaschik BA, Zhang K, So AI et al. (2008) Oncolytic vesicular stomatitis viruses are potent agents for intravesical treatment of high-risk bladder cancer. *Cancer Res* 68: 4506–4510
9. Hall MC, Chang SS, Dalbagni G et al. (2007) Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1 and Tis): 2007 update. *J Urol* 178: 2314–2330
10. Han RF, Pan JG (2006) Can intravesical bacillus Calmette-Guerin reduce recurrence in patients with superficial bladder cancer? A meta-analysis of randomized trials. *Urology* 67: 1216–1223
11. Hanel EG, Xiao Z, Wong KK et al. (2004) A novel intravesical therapy for superficial bladder cancer in an orthotopic model: oncolytic reovirus therapy. *J Urol* 172: 2018–2022
12. Herr HW, Sogani PC (2001) Does early cystectomy improve the survival of patients with high risk superficial bladder tumors? *J Urol* 166: 1296–1299
13. Lyons SK (2005) Advances in imaging mouse tumour models in vivo. *J Pathol* 205: 194–205
14. O'Donnell MA, Boehle A (2006) Treatment options for BCG failures. *World J Urol* 24: 481–487
15. Pagliaro LC, Keyhani A, Williams D et al. (2003) Repeated intravesical instillations of an adenoviral vector in patients with locally advanced bladder cancer: a phase I study of p53 gene therapy. *J Clin Oncol* 21: 2247–2253
16. Papageorgiou A, Lashinger L, Millikan R et al. (2004) Role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in interferon-induced apoptosis in human bladder cancer cells. *Cancer Res* 64: 8973–8979
17. Parato KA, Senger D, Forsyth PA et al. (2005) Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* 5: 965–976
18. Power AT, Wang J, Falls TJ et al. (2007) Carrier cell-based delivery of an oncolytic virus circumvents antiviral immunity. *Mol Ther* 15: 123–130
19. Qu XJ, Yang JL, Russell PJ et al. (2004) Changes in epidermal growth factor receptor expression in human bladder cancer cell lines following interferon-alpha treatment. *J Urol* 172: 733–738
20. Ramesh N, Ge Y, Ennist DL et al. (2006) CG0070, a conditionally replicating granulocyte macrophage colony-stimulating factor – armed oncolytic adenovirus for the treatment of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 12: 305–313
21. Stark GR, Kerr IM, Williams BR et al. (1998) How cells respond to interferons. *Ann Rev Biochem* 67: 227–264
22. Stojdl DF, Lichty B, Knowles S et al. (2000) Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med* 6: 821–825
23. Stojdl DF, Lichty BD, tenOverer BR et al. (2003) VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4: 263–275
24. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Lamm DL (2002) Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 168: 1964–1970
25. Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W et al. (2006) Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 49: 466–475
26. Vaha-Koskela MJ, Heikkila JE, Hinkkanen AE (2007) Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer Lett* 254: 178–216
27. Watanabe T, Shinohara N, Sazawa A et al. (2000) An improved intravesical model using human bladder cancer cell lines to optimize gene and other therapies. *Cancer Gene Ther* 7: 1575–1580