

# Durchbrechen von Therapieresistenzen

**Volker Schirmmacher**

**Wiener klinisches Magazin**

ISSN 1869-1757

Wien klin Mag

DOI 10.1007/s00740-015-0070-5



**Your article is published under the Creative Commons Attribution license which allows users to read, copy, distribute and make derivative works, as long as the author of the original work is cited. You may self-archive this article on your own website, an institutional repository or funder's repository and make it publicly available immediately.**



# Durchbrechen von Therapieresistenzen

## Therapeutischer Einsatz onkolytischer Viren am Beispiel des Newcastle-Disease-Virus

**In den letzten zehn Jahren wurden neue Werkzeuge und Konzepte einer biologischen Krebstherapie mithilfe onkolytischer Viren entwickelt. Derartige Viren zeigen hohe Tumorselektivität in Bezug auf Virusvermehrung und virusinduzierte Tumorzellzerstörung. Indem solch virusinduzierter Tumorzelltod in der Regel immunogen verläuft, wird das körpereigene Immunsystem dabei unterstützt, Tumorzellen spezifisch zu erkennen und anschließend zu beseitigen. OV's sind also neue immuntherapeutische Agenzien, deren Antitumoreffekte auf direkter Onkolyse sowie auf der nachfolgend induzierten antitumoralen Immunantwort und dem damit assoziierten antitumoralen immunologischen Gedächtnis basieren. Wie OV's sinnvollerweise in der Krebsbehandlung eingesetzt werden können, soll am Beispiel eines Vogelvirus aufgezeigt werden. Dieses selbst replizierende biologische Therapeutikum scheint das Potenzial zum Durchbrechen von Therapieresistenzen zu haben. Solch ein wichtiges Potenzial sollte in Zukunft zur Verbesserung der Krebsbehandlung genutzt werden.**

### Einleitung

Onkolytische Viren (OVs) sind selbstreplizierende biologische Krebstherapeutika. Sie vermehren sich ausschließlich in Tumorzellen und führen zu deren Zelltod (virale Onkolyse) [1, 2]. Bis jetzt wurden mehr als 20 verschiedene Viren mit onkolytischer Aktivität charakterisiert. Vie-

le solcher Viren wurden genetisch verändert, um eine Tumorselektivität zu erhalten, z. B. die humanen DNA-Viren Adenovirus (AdV) oder Herpes-simplex-Virus (HSV). Andere Viren wurden mit zusätzlichen Transgenen verändert, wie z. B. die RNA-Viren Masernvirus (MV) und Vesikular-Stomatitis-Virus (VSV). Einige Viren haben den Vorteil, dass sie schon als Wildtyp oder in attenuierter Form Tumorselektivität aufweisen. Hierzu gehören das Vogelvirus Newcastle-Disease-Virus (NDV), Sindbis-Virus, das Minute-Virus der Maus, das Parvovirus der Ratte und das humane Reovirus. Es ist bemerkenswert, dass drei der klinisch besonders vielversprechenden onkolytischen Viren, nämlich NDV, VSV und MV-RNA-Viren der gleichen Familie darstellen. Diese Paramyxoviren haben ein ähnliches Genom, nämlich eine einsträngige RNA in negativer Orientierung (-ss RNA) [1].

Bei der Mehrzahl von klinischen Studien wurden OV's intratumoral appliziert. Eine kleinere Zahl von Studien untersuchte Effekte nach lokoregionaler oder systemischer (i.v.) Applikation. Derartige Studien zeigten günstige Toxizitäts- und Sicherheitsprofile [3]. Die antitumorale Wirksamkeit war allerdings nur limitiert. Zum Beispiel wurde nach intratumoraler Applikation von ONYX-015, einem genetisch modifizierten AdV, eine Response-Rate von nur 0–14% erhalten. Ein Problem besteht darin, dass eine maximal mögliche Onkolyse durch antivirale Immunreaktivität eingeschränkt wird.

Man muss hierbei aber auch berücksichtigen, dass die therapeutische Applikation von OV's erst eine kurze Geschichte aufweist, dass die Applikation nicht mit

anderen Modalitäten kombiniert wurde und dass es inzwischen wissenschaftliche Fortschritte hinsichtlich der Methoden von „virus delivery“ und zur Erhöhung antitumoraler Potenz gibt. Weitere Informationen zur Evolution von OV's und deren klinischer Anwendung finden sich in einem umfassenden Review [4].

Dieser Beitrag soll am Beispiel von NDV zeigen, welche Möglichkeiten des therapeutischen Einsatzes bereits ausprobiert wurden und mit welchen Ergebnissen. Mesogene attenuierte Stämme (MTH68/H [5], PV701 [6]) oder lentogene Stämme (Ulster [7], HUI [8]) wurden und werden auch weiter zur Applikation in Krebspatienten verwendet. Erste Hinweise auf antineoplastische und immunstimulierende Eigenschaften von NDV wurden bereits vor etwa 50 Jahren erhalten [9].

### I. Grundlagen

#### I.1 Tumorselektivität von Virusreplikation und Onkolyse

Im Allgemeinen unterliegen Viren bezüglich Zellinfektion und Replikation einem strikten Tropismus, der spezifisch für einen bestimmten Zelltyp, ein Gewebe oder eine Spezies ist [10, 11]. Ein Vogelvirus wie NDV beispielsweise ist permissiv für Vogelzellen und kann sich darin gut vermehren. Es handelt sich bei NDV um ein membranumhülltes Vogelvirus von 100–300 nm Durchmesser, das der Familie der Paramyxoviren zuzuordnen ist und diverse Stämme mit unterschiedlicher Virulenz in Vögeln umfasst. Mesogene und velogene Stämme können fatale respira-

**Tab. 1** NDV: Zellinfektion und Replikation

Ein Vogel Paramyxovirus vom Typ 1 (APMV-1)
Sein – Strang-RNA-Genom von ca. 16.000 Nucleotiden enthält 6 Gene, die für die viralen Proteine NP, P, M, F, HN und L kodieren
In viruspermissiven Vogelzellen kann sich NDV gut replizieren und pathologische Effekte erzeugen; je nach Intensität dieser Effekte, werden NDV-Stämme in niedrigvirulent (lentogen), mittelvirulent (mesogen) und hochvirulent (velogen) unterteilt
Virusbindung an nicht permissive humane Zellen wird über HN, Membranfusion über F vermittelt
Nach Transduktion des viralen Genoms ins Zytoplasma der Zelle, findet dort die Transkription viraler Gene statt
In normalen humanen Zellen führt eine NDV-Infektion zur Aktivierung antiviraler Abwehrmechanismen, die über Interferon (IFN)- $\alpha$ und - $\beta$ gesteuert wird
In humanen Tumorzellen sind die Typ-I-IFN-Signalwege häufig mutiert, sodass die Virusabwehr geschwächt ist; daher kann die Virusreplikation, die über eine + Strang-Genom-Kopie verläuft, nicht gestoppt werden

torische Erkrankungen hervorrufen, weswegen auf Hühnerfarmen in Europa dagegen immunisiert wird. In permissiven Vogelzellen kann NDV die interferonvermittelte zelluläre Virusabwehr mithilfe seines V-Proteins unterwandern (Escape-Mechanismus) [10]. Dieses V-Protein ist jedoch speziesspezifisch und funktioniert nicht in nicht permissiven Zellen, wie z. B. Zellen des Menschen.

Nicht permissive Zellen können von NDV zwar infiziert werden, aber die starke Interferonantwort verhindert die Virusreplikation. Anders sieht es aus bei Krebszellen. OV's verbreitern ihren ursprünglichen Tropismus auf Krebszellen von nicht permissiven Wirtsorganismen. Einige OV's zeigen aberrante, nicht produktive Infektionen in Tumorzellen von nicht nativen Wirten und führen dabei zu Mechanismen des Zelltodes, die sich von denen in Zellen des natürlichen Wirts unterscheiden. Der Mechanismus von Zelltod spielt für die Immunantwort eine große Rolle. Die Mechanismen, die der Tumorselektivität von OV's in nicht permissiven Wirten zugrundeliegen, beinhalten oft veränderte Signalwege (z. B. EGFR, p53, PKR, Ras, RB/E2F/p16, Wnt), Antiapoptose oder Defekte bei Typ-I-Interferon-Signalen, die für Virusabwehr und Immunstimulation von Bedeutung sind [11–13].

■ **Tab. 1** vermittelt eine Übersicht über Zellinfektion und Replikation von NDV.

## 1.2 Immunogener Tumorzelltod (ICD)

Während der klassische induzierte Zellselbstmord (Apoptose) zu einem nicht immunogenen Zelltod führt, induzieren OV's verschiedene Arten von immunogenem Zelltod (ICD), z. B. immunogene Apoptose, Nekroptose, Pyroptose oder Autophagie [14, 15].

OV-induzierte Autophagie in Krebszellen steigert die Kreuzpräsentation über dendritische Zellen (DCs) von tumorassoziierten Antigenen (TAAs). Krebszellen haben während der Karzinogenese oft veränderte apoptotische Signalwege entwickelt, die die Zellen auch resistent gegenüber bestimmten Therapien machen. Einige OV's, wie z. B. Vacciniavirus, induzieren in Krebszellen nekroptotischen Zelltod, während andere OV's, wie z. B. AdV, in Krebszellen eher autophagischen Zelltod hervorrufen. Inzwischen sind von den wichtigsten OV's die viralen Gene bekannt, die zur Modulation von Apoptose, Autophagie oder Nekroptose in Tumorzellen führen [15].

Bei diesen Prozessen werden sog. PAMPs und DAMPs freigesetzt, die als Gefahrensignale vom Immunsystem wahrgenommen werden. PAMPs sind pathogenassoziierte molekulare Strukturen, wie z. B. virale RNA oder DNA, die durch Toll-like-Rezeptoren (TLRs) oder RIG-like-Rezeptoren (RLRs) erkannt werden. Als DAMPs werden molekulare Strukturen bezeichnet, die im Rahmen von Gewebszerstörung endogen freigesetzt oder disloziert werden. Beispiele sind Calretikulin, extrazelluläres ATP, Hitzeschock-

proteine (HSP), HMGB1, Harnsäure oder Histone. Diese werden durch Rezeptoren wie CD91, P2Y2, TLRs oder P2Y6 erkannt [14, 15].

Tumorselektivität, Onkolyse und ICD sind Phänomene, die miteinander räumlich und zeitlich in Beziehung stehen. Virusinfektion bedeutet erhöhte Produktion viraler Proteine innerhalb der Zelle und an der Zelloberfläche. Dies geht einher mit Zellstress. Die Stressreaktion des endoplasmatischen Retikulums (ER stress response) involviert die Aktivierung von PERK und die Phosphorylierung des Translations-Initiiierungsfaktors eIF2 $\alpha$ , was zur Abschaltung der Proteinsynthese führt.

Im Gegensatz zu physiologisch bedingter Apoptose, die nicht immunogen ist, induziert NDV eine immunogene Apoptose. Die Zelloberfläche wird mit Calretikulin, HSPs und mit den viralen Proteinen Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) und Fusionsprotein (F) dekoriert, was bereits zu immunologischen Reaktionen führt. Ferner kommt es zur Hochregulation von MHC- und Adhäsions-Molekülen, wodurch die Interaktion mit T-Zellen verbessert wird [16]. Im Zytoplasma wird die fremde virale RNA von RIG-I-Rezeptoren als Gefahr erkannt. Daraufhin kommt es zur Freisetzung von Interferonen, proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen (RANTES, IP-10) [16] und von DAMPs. Die Zelle verendet durch nekrotische Plasmamembran-Permeabilisation.

Durch NDV initiierte Antitumoreffekte umfassen direkte wie auch indirekte Mechanismen. Zu den direkten Effekten gehören die Bildung von Syncytien, die Aktivierung von extrinsischen und intrinsischen apoptotischen Signalwegen sowie die Aktivierung einer ER-Stress-Antwort und des MAPK-Signalwegs. Zu den indirekten Mechanismen gehören die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, was zur Rekrutierung und Aktivierung von Zellen des natürlichen und des adaptiven Immunsystems führt [11].

V. Schirmacher

## Durchbrechen von Therapieresistenzen. Therapeutischer Einsatz onkolytischer Viren am Beispiel des Newcastle-Disease-Virus

### Zusammenfassung

Dieser Review gibt einen Überblick über therapeutische Einsatzmöglichkeiten onkolytischer Viren (OVs) am Beispiel eines Vogelvirus, des Newcastle-Disease-Virus (NDV). Seine Tumorselektivität und die Fähigkeit zur Selbstreplikation unterscheiden dieses biologische Therapeutikum von chemischen oder physikalischen Krebsbehandlungsmethoden, wie Chemotherapie (CT) oder Radiotherapie (RT). Im Gegensatz zu CT und RT ist die Onkolyse durch NDV unabhängig von Zellteilung. Daher hat dieses sich im Zytoplasma vermehrende RNA-Virus das Potenzial, auch Krebszellen in einem Ruhestadium, wie Tumorstammzellen oder metastaseninitiierende Zellen zu infizieren und abzutöten. Unerwünschte Nebenwirkungen durch NDV sind viel geringer als jene von CT oder RT.

Viele genetisch veränderte OVs versuchen, eine maximale Onkolyse durch Reduk-

tion von antiviraler Immunität zu erzielen.

Hier werden Beispiele vorgeführt, wie im Falle von onkolytischem NDV antivirale Immunität und die immunstimulierende Kapazität eines OVs so integriert werden können, dass eine maximale postonkolytische T-Zell-vermittelte Antitumorimmunität entsteht.

NDV induziert immunogenen Zelltod (ICD) mit multiplen Effekten auf das Immunsystem. Aktivierte Zellen des natürlichen und adaptiven Immunsystems helfen dabei, Tumorzellen zu zerstören, sodass eine maximale direkte Onkolyse durch das Virus gar nicht erforderlich ist. Tumorspezifische T-Zell-Antworten sind zusätzlich mit einer Gedächtnisfunktion ausgestattet, die über lange Zeiträume eine Schutzfunktion gegenüber minimaler residueller Erkrankung ausüben kann. Tumorspezifische T-Zell-Antworten werden insbesondere erhalten nach Antitumorvakzinie-

rung mit autologen Krebsimpfstoffen, wie ATV-NDV und VOL-DC, die NDV als Gefahrensignalvermittler enthalten. Ergebnisse aus klinischen Studien und von Einzelfallverläufen bei Kombinationstherapien werden vorgestellt.

NDV hat auch das Potenzial, Tumorresistenzen zu durchbrechen. Solche Resistenzen können durch CT, RT oder auch durch Immuntherapie entstehen. Von daher sind die Einsatzmöglichkeiten von NDV in der Krebstherapie noch keineswegs ausgeschöpft.

### Schlüsselwörter

Virale Onkolyse · Immunogener Zelltod · Antitumorimmunität · Immuntherapie · Krebsimpfstoff · Therapieresistenz

## Breaking therapy resistance. Therapeutic administration of oncolytic viruses exemplified with Newcastle disease virus

### Abstract

This review provides an overview of the therapeutic administration of oncolytic viruses (OVs), in particular of the bird virus Newcastle disease virus (NDV). Its tumor selectivity and capacity to replicate distinguish it from chemical or physical means of cancer therapy such as chemotherapy (CT) or radiotherapy (RT). In contrast to CT and RT, oncolysis by NDV is independent of cancer cell division. That is why this RNA virus, which replicates in the cytoplasm, has the potential to also attack cancer cells in a resting state, e.g., tumor stem cells or metastasis-initiating cells. Negative side effects of NDV are negligible compared to CT or RT.

Many genetically engineered OVs try to achieve maximal tumor cell killing by redu-

cing antiviral immunity. This review presents examples that—in the case of NDV—antiviral immunity and immunostimulatory capacities of an OV can be integrated to achieve maximal postoncolytic T cell mediated antitumor immunity.

NDV induces immunogenic cell death (ICD) with multiple effects on the immune system. Activated cells of the innate and the adaptive immune system help to destroy tumor cells so that direct maximal tumor cell killing by the virus is not necessary. Tumor-specific T cell responses are equipped with a memory function. This provides protective activity over long periods of time against minimal residual disease. Tumor-specific T cell responses can be obtained in particularly by

antitumor vaccination with cancer vaccines containing NDV, such as ATV-NDV or VOL-DC. Results from clinical studies and from case reports of combination therapies are also presented.

NDV also has the potential to break resistance to therapy. Such resistances can occur during CT, RT, or immunotherapy. In this respect, the possibilities of therapeutic application of oncolytic NDV have not yet been fully exploited.

### Keywords

Viral oncolysis · Immunogenic cell death · Antitumor immunity · Immunotherapy · Cancer vaccines · Therapy resistance

### 1.3 Postonkolytische T-Zell-Immunantwort

Bei der Initiierung einer postonkolytischen T-Zellantwort spielen DCs eine entscheidende Rolle. Im Unterschied zu B-Lymphozyten können T-Zellen mit ihren antigenspezifischen Rezeptoren (TCR) Antigene nicht direkt erkennen. Sie bedürfen hierzu der Vermittlung durch hie-

rauf spezialisierte professionelle antigenpräsentierende Zellen, wie es die DCs sind. DCs können Antigene, etwa solche von Tumorzellen (inklusive TAAs) aufnehmen, die Proteine intern prozessieren und Bruchstücke davon (sog. Peptide) über spezielle Eiweißmoleküle (MHC-I oder MHC-II) an der Zelloberfläche den CD8 zytotoxischen oder CD4-T-Helferzellen präsentieren. Deren TCRs passen

wie ein Schlüssel zum Schloss an die entsprechenden Peptid-MHC-Komplexe der TAAs.

DC vermitteln den T-Zellen nicht nur Informationen zu TAAs, sondern auch zum umgebenden Gefahrenpotenzial. Erst wenn T-Zellen gleichzeitig Signale über den antigenspezifischen TCR und zusätzliche Gefahrensignale über DCs erhalten, werden sie aktiviert. DCs scree-

**Tab. 2** NDV: Tumorzellonkolyse, immunogener Zelltod (ICD) und Immunantwort

Virusinfektion und Replikation in Tumorzellen erzeugt eine Stressantwort des endoplasmatischen Retikulums (ER stress response); diese führt zu einer Abschaltung der Proteinsynthese
Vor der Onkolyse werden auf der Zelloberfläche Calreticulin (Ecto-CRT), Hitzeschockproteine (HSPs) und die viralen Proteine HN und F exprimiert; im Zytoplasma wird die fremde virale RNA als PAMP durch den Rezeptor RIG-I erkannt, wodurch eine Reaktion ausgelöst wird, die zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, Interferone und Chemokine führt. Es kommt auch zur Hochregulation von MHC und Adhäsionsmolekülen
Darauf folgt eine immunogene Apoptose, die durch Membranintegrität, Zellschrumpfung und Freisetzung von apoptotischen Körperchen charakterisiert ist
Spätere Phasen nach NDV Infektion sind durch Membran-Schwellung, Membran-Auflösung und Freisetzung von intrazellulären DAMPs charakterisiert; es handelt sich hierbei um Phänomene von Nekrose (Nekroptose mit ROS); schließlich kann es auch zur Pyroptose mit Kernkondensation und DNA-Fragmentierung kommen
DCs aus der Nachbarschaft der In-situ-Onkolyse werden durch PAMPs und DAMPs aktiviert; über Makropinozytose werden apoptotische Körperchen und Onkolysat von DCs aufgenommen und zwecks Antigenpräsentation an T-Zellen verarbeitet
Das im Onkolysat enthaltene NDV führt in DCs zu einer Umprogrammierung und Polarisierung in Richtung von DC1; diese Polarisierung begünstigt eine zelluläre T-Zell-vermittelte Immunantwort; Typ-I-Interferone verbessern die Kreuzpräsentation von TAAs an CD8-T-Killerzellen
Kontakt mit NDV führt zur Aktivierung von NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen, DCs und zur Kostimulation von CD4- und CD8-T-Lymphozyten

nen das Gefahrenpotenzial ihrer Umgebung durch die schon erwähnten Rezeptoren für PAMPs und DAMPs.

NDV aktiviert sowohl Zellen der natürlichen Immunität, wie NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen und DCs, wie auch solche des adaptiven Immunsystems (Kostimulation von CD4- und CD8T-Zellen) [7, 13].

In **Tab. 2** sind wichtige Fakten zur Tumorzellonkolyse durch NDV, zum ICD und zur Immunantwort zusammengefasst.

### 1.4 Antitumor-Effektormechanismen und antitumorales immunologisches Gedächtnis

CD4-T-Helferzellen und CD8-T-Killerzellen spielen eine entscheidende Rolle bei adaptiven antitumoralen Immunreaktionen. Durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen rekrutieren T-Helferzellen Effektorzellen der natürlichen Immunität wie Makrophagen, Granulozyten oder Eosinophile und aktivieren DCs, wodurch das „Priming“ von CD8-T-Zellen verbessert wird. CD8-Killerzellen (CTL) sind die Haupteffektorzellen des adaptiven Immunsystems. CTLs enthalten lytische Granula, die nach Stimulation über die immunologische Synapse in die anvisierten abzuwehrenden Zielzellen (z. B. Tumorzellen) übertragen werden. Über

Perforine werden Poren in die Zielzellmembran eingebracht, durch die Serin-Proteasen (Granzyme) gezielt in die Zielzelle gelangen. Letztere aktivieren darin dann ein kaskadenartig arbeitendes Enzymsystem, die Caspasen, was zur Apoptose der Zielzelle führt.

Bei nicht lytischen Viren, die die infizierte Zielzelle nicht töten, spielt der Perforin/Granzym-Weg eine entscheidende Rolle. Für lytische Viren, die schnell eine infizierte Zielzelle zerstören, spielen von CTLs freigesetzte Zytokine eine wichtigere Rolle als der Perforin/Granzym-Weg.

Nach Infektion oder Vakzinierung proliferieren spezifische T-Zellen und expandieren innerhalb von 1–2 Wochen zu einer massiven Effektorzellpopulation. Danach sorgt ein eingebautes Selbstregulationsprogramm für das Abklingen der Reaktion. Die Frequenzen spezifischer T-Zellen reduzieren sich, indem mehr als 90 % der T-Zellen in Apoptose gehen.

Die übrig gebliebenen spezifischen T-Zellen differenzieren in Gedächtnis-T-Zellen und können über lange Zeiträume auf einem niedrigen Frequenzniveau erhalten bleiben. Bei erneutem Kontakt mit dem spezifischen Antigen (z. B. TAA) reagieren Gedächtnis-T-Zellen sehr viel schneller als naive T-Zellen. Sie sind auch potenter und multifunktional. Neben CD4- und CD8-Gedächtniszellen lassen sich noch weitere Untertypen

differenzieren, z. B. zentrale Gedächtniszellen in lymphatischem Gewebe und Effektorgedächtniszellen in extralymphatischem Gewebe. Eine besondere Rolle bei der Aufrechterhaltung von immunologischem Gedächtnis spielt das Knochenmark. Dort gibt es spezielle Nischen, in denen derartige T-Zellen andocken können und wo sie mit geeigneten Zytokinen versorgt werden, die für das Langzeitüberleben wichtig sind [17].

## II. Therapeutischer Einsatz von NDV

Die beim Menschen gut verträglichen onkolytischen NDV vermehren sich ausschließlich in Tumorzellen, zerstören diese und aktivieren das Immunsystem. Da gesunde Zellen auf das Virus mit einer im Vergleich zu Tumorzellen stärkeren interferonvermittelten Abwehr reagieren, werden sie nicht geschädigt. Es besteht also eine hohe Sicherheit bei der klinischen Anwendung des Virus [11–13].

Krebspatienten können sogar hohe Dosen infektiöser Viruspartikel gut vertragen. Weitere vorteilhafte Charakteristika von NDV basieren auf seiner Molekularbiologie: eine modulare Natur der Gentranskription, eine nicht detektierbare Rate von Rekombination, die Abwesenheit einer DNA-Phase im viralen Replikationszyklus und Möglichkeiten einer robusten Virusproduktion in Eiern oder aus Zellkultur.

### II.1 Applikationen von NDV als Einzelagens zur Krebsbekämpfung

Seit der Veröffentlichung von antineoplastischen Effekten von NDV 1965 [8], wurde dieses Virus als onkolytisches Agens getestet, wobei verschiedene Applikationsarten verwendet wurden: intratumoral, lokoregional, intravenös oder intranasal.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde nachgewiesen, dass die intratumorale Applikation von NDV in einem Glioma-Modell in immunkompetenten Mäusen zu immunogenem Tumorzelltod führt. Das hatte die Induktion von tumorspezifischen Gedächtnis-T-Zellen zur Folge und führte zu verbessertem Gesamtüberleben [18].

In einer klinischen Phase-II-Studie wurde onkolytisches NDV 33 Krebspatienten im fortgeschrittenen Stadium appliziert. Um deren Lungenmetastasen lokoregional zu erreichen, wurde das Virus per Inhalation appliziert. Die hohen Virusdosen wurden gut vertragen. Obwohl es sich nicht um eine randomisierte Studie handelte, wiesen die Ergebnisse auf eine Abnahme von durch den Krebs hervorgerufenen Symptomen und auf ein verbessertes Überleben hin [5].

Die systemische Applikation wurde in einer Phase-I-Dosis-Eskalationsstudie bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren erprobt. Virusdosen von  $3 \times 10^9$  infektiösen Partikeln wurden gut vertragen. Dosislimitierende Toxizitäten betrafen Dyspnoe, Diarrhö und Dehydrierung. Wenn Patienten vorher mit einer niedrigeren Virusdosis desensibilisiert wurden, konnte die maximal tolerierbare Dosis (MTD) um einen Faktor 10 erhöht werden [19].

Nach intranasaler NDV-Applikation in Mäusen, konnte im Lungengewebe die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen und von Typ-I-Interferonen nachgewiesen werden [20].

## II.2 Antitumorale Impfstoffe

Durch aktiv-spezifische Immunisierung (ASI) kann dem Immunsystem dabei geholfen werden, körpereigene Tumorzellen zu erkennen und zu bekämpfen. Durch mehrfache Immunisierung entsteht ein Lernprozess, bei dem die Erkennung von TAAs mit Gefahr assoziiert wird. Dabei dient das onkolytische Virus NDV als Helfer der Immuntherapie. Die Kombination von NDV mit Tumorzellen führt zu Impfstoffen, wie etwa Onkolysaten [21] oder Lebendzellvakzinen [22]. Letztere haben den Vorteil gegenüber ersteren aufgrund ihrer erhöhten Immunogenität. Hier sollen insbesondere zwei Impfstoffe vorgestellt werden, bei denen NDV beteiligt ist, nämlich ATV-NDV und VOL-DC.

### II.2.1 ATV-NDV

Bei ATV-NDV handelt es sich um einen Impfstoff, der aus bestrahlten patienteneigenen (autologen) Tumorzellen besteht, die durch Infektion mit NDV immunogener gemacht werden. Der Name steht

für Autologe Tumor Vakzine, modifiziert durch Infektion mit NDV. Der Impfstoff wurde zunächst in Tiermodellen mit metastatischen Tumorzellen zur postoperativen Prophylaxe gegen Metastasen entwickelt und dann auf das Humansystem übertragen. Da die in den Tiermodellen erzielte protektive Immunität für den jeweiligen Tumor und Impfstoff spezifisch war, wurde bei der Übertragung auf menschliche Tumorerkrankungen Wert auf die Herstellung eines autologen Impfstoffs gelegt, auch wenn dieses mit zusätzlichen Komplikationen verbunden war. Um 10–20 Mio. lebende Tumorzellen pro Vakzine aus frisch operiertem Tumor zu gewinnen, wurden die Verfahren kontinuierlich verbessert. Nachdem in Phase-I-Studien die optimale Komposition bezüglich Zellzahl und Virusdosis ermittelt worden war, die nötig ist, um eine gute DTH („delayed-type hypersensitivity“) Impfreaktion in der Haut des Patienten zu erzielen, wurden diverse klinische Studien postoperativ durchgeführt, um in Analogie zu den Tiermodellen das Gesamtüberleben (OS) oder das rezurrenzfreie bzw. metastasenfremde Überleben zu verbessern.

In den Jahren zwischen 1990 und 2008 wurden in Zusammenarbeit mit Heidelberger Universitätskliniken 9 klinische Studien durchgeführt. Zu den Tumorarten, bei denen die postoperative Immuntherapie mit ATV-NDV positive Effekte auf das OS erzielte, gehören das Kolonkarzinom in den Stadien II, III und IV [23], Brustkrebs [24], Ovarialkarzinom, Pankreaskarzinom, Nierenkarzinom, Kopfhals-Tumoren und das Glioblastom [25]. Weitere Details sind in entsprechenden Reviews zu finden [7, 13, 26].

Von besonderer Bedeutung ist eine Phase-II/III-Studie, die prospektiv-randomisiert durchgeführt werden konnte. Diese Studie untersuchte die Effizienz der ATV-NDV-Vakzine nach Resektion von Lebermetastasen bei Kolorektalkarzinomen (Stadium IV) als eine tertiäre Präventionsmethode. 25 Patienten wurden vakziniert und mit einer nicht vakzinierten vergleichbaren Gruppe verglichen. Nach einer langen Nachbeobachtungsperiode von etwa 10 Jahren gab es bei Dickdarmkrebspatienten einen signifikanten Überlebensvorteil im vakzinierten Arm, nicht aber bei den Enddarm-

krebspatienten. Unabhängig von der Frage, warum die Impfmethode bei den Rektumkarzinompatienten nicht funktioniert, bleibt festzuhalten, dass bei Kolonkarzinompatienten nur 30,8% im vakzinierten Arm verstorben waren im Vergleich zu 78,6% in dem nicht vakzinierten Kontrollarm [23, 27].

Da es nicht viele erfolgreiche prospektive, randomisierte, kontrollierte Studien zur Antitumorvakzinierung gibt, soll hier noch eine Studie erwähnt werden, bei der Kolonkarzinompatienten im Stadium II postoperativ mit einer autologen Tumorzellvakzine geimpft wurden und zusätzlich BCG (ein bakterielles Adjuvans) erhielten. Auch hier wurde eine signifikante Verbesserung im Überleben erzielt [28].

Bei den klinischen Studien zu ATV-NDV lag der Anteil an Patienten, die einen Überlebensvorteil davon hatten, bei beachtlichen ca. 30%. Das bedeutet umgekehrt natürlich auch, dass etwa 70% davon nicht profitierten. Um die Ansprechraten weiter zu erhöhen, wurden zwei Strategien verfolgt. Die eine, die hier nur kurz erwähnt werden kann, besteht in der Kombination der Vakzine ATV-NDV mit bispezifischen Antikörpern, die weitere T-Zell-aktivierende Signale vermitteln können [29]. Die zweite Strategie besteht in der Kombination von ATV-NDV mit dendritischen Zellen. Dadurch soll die Fähigkeit verbessert werden, *de novo* TAA-spezifische T-Zellen aus naiven T-Zellen zu generieren. Die Vakzine ATV-NDV ist eher in der Lage, TAA-spezifische Gedächtniszellen zu reaktivieren.

### II.2.2 VOL-DC

Personalisierte Medizin gilt als Grundlage für das ärztliche Handeln am Immunologisch-Onkologischen Zentrum Köln (IOZK). Im April 2015 erhielt das IOZK die Genehmigung zur Herstellung eines patienteneigenen (autologen) DC-basierenden Tumorimpfstoffs gemäß Arzneimittelrichtlinie für neuartige Therapien. Der Impfstoff ist nicht auf einen bestimmten Typ von Krebs beschränkt. Daher ist das Konzept universal anwendbar, das Produkt wird jedoch individuell hergestellt.

Es gibt Protokolle zur Generierung von tolerogenen sowie von immunogenen DCs [30]. Wenn man eine DC-Vakzine zur klinischen Anwendung bringt, ist

es wichtig, sich des Unterschiedes bewusst zu sein. Für die immunogene DC-Vakzine des IOZK werden unreife DCs mit Antigen beladen, dann weiter zur Reifung gebracht und in Richtung DC1 polarisiert.

Es handelt sich bei der VOL-DC-Vakzine, die in Köln zur Anwendung kommt, um einen Impfstoff, der aus drei Komponenten besteht: 1) Patienteneigene DCs, die aus Monozyten des Bluts in Kultur gezüchtet werden, 2) patienteneigene Tumorzellen, die von einer Probe des Tumors entnommen und in Kultur gebracht werden und 3) onkolytisches NDV. Die Tumorzellen werden zunächst mit NDV infiziert, um daraus das virale Onkolyat VOL herzustellen. Mit diesem Produkt werden dann die DCs „gefüttert“. Diese nehmen das Lysat ins Zellinnere auf, verarbeiten es auf spezielle Weise und präsentieren anschließend an ihrer Zelloberfläche Bruchstücke (Peptide) der Eiweiße.

Ein Teil davon kann jetzt als TAA von T-Zellen erkannt werden. Die DCs vermitteln den T-Zellen des Weiteren sog. kostimulatorische Signale und auch sog. Gefahrensignale. Letztere stammen von der Virusinfektion, die durch spezielle Rezeptoren der DCs (RIG und TLR) erkannt werden und zu einer Zellaktivierung und Umprogrammierung der DCs führen.

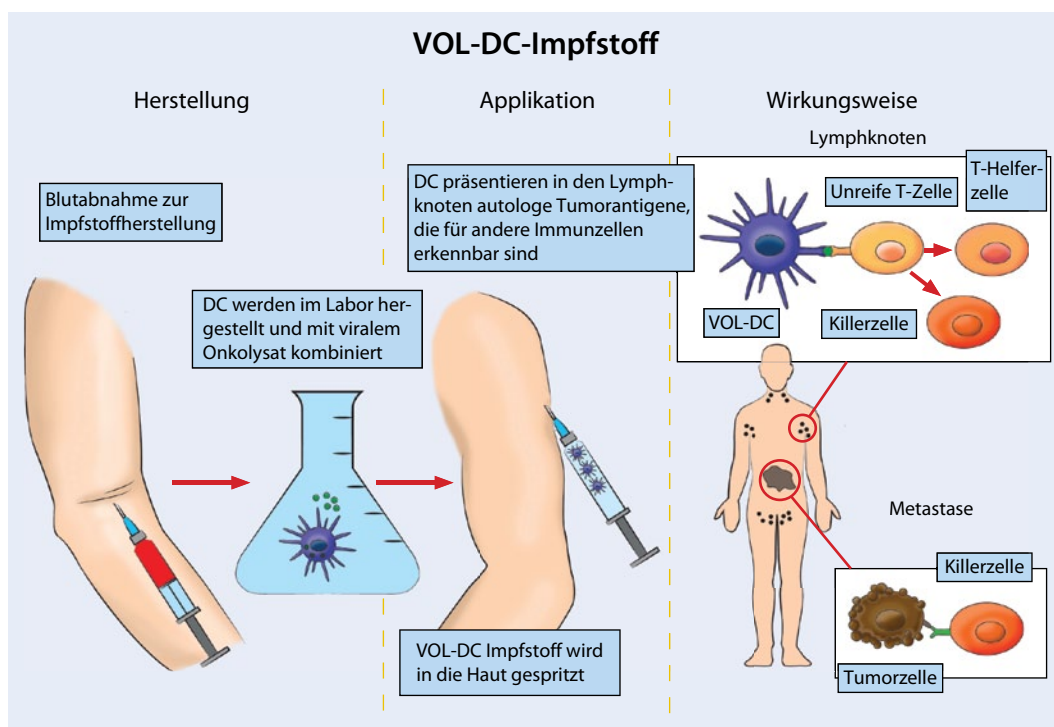
Durch die Infektion mit NDV werden DCs in einen immunogenen Phänotyp umprogrammiert. Dieser Vorgang, bei dem diverse Transkriptionsfaktoren beteiligt sind und hunderte von Genen hochreguliert werden, ist bereits nach 18 h vollendet [31]. So zu DC1 polarisiert, können die VOL-DCs wertvolle Informationen über TAAs aus dem Onkolyat an T-Zellen übertragen und diese dabei aktivieren.

Durch mehrfache Impfung werden im Patienten tumorspezifische zytotoxische und T-Helferzellen generiert, die Anti-

tumoreffekte ausüben. Aus ihnen entstehen danach langlebige immunologische Gedächtnis-T-Zellen, die eine nachhaltige Sekundärprophylaxe gegen Metastasen ausüben.

Der Impferfolg wird durch regelmäßiges Immunmonitoring überprüft. Hierbei werden T-Zellen nach der Therapie mit T-Zellen vor der Therapie im Labor verglichen. Diese werden mit VOL-DCs für 48 h koinkubiert. Dann wird in einem ELISPOT-Test die Zahl der Interferon- $\gamma$ -produzierenden Zellen bestimmt. Dieser Test wird auch als Verlaufsparmeter genutzt. Sollte die Immunantwort nach einem längeren Abstand abnehmen, dann wird eine erneute Vakzination durchgeführt.

■ **Abb. 1** zeigt ein Schema zu Herstellung, Applikation und Wirkungsweise des Impfstoffs VOL-DC.



**Abb. 1** ▲ Schema zur Herstellung, Applikation und Wirkungsweise des Impfstoffs VOL-DC. Entnommene Tumorzellen des Patienten werden in Zellkultur mit einem onkolytischen (tumorzerstörenden) Virus infiziert und in Lösung gebracht (lysiert). Zur Herstellung des Impfstoffs wird das Onkolyat nun mit Spezialzellen desselben Patienten (dendritischen Zellen, DC) kombiniert. Die DCs verarbeiten das Onkolyat so, dass bestimmte Bestandteile davon, sog. Tumorantigene, für andere Immunzellen (T-Zellen) erkennbar werden. Zusätzlich vermittelt der Impfstoff wichtige Aktivierungssignale für die T-Zellen. Wirkungsweise: Von der Injektionsstelle der Haut wandern die DCs in den nächstgelegenen Lymphknoten, um dort eine Anti-Tumor-Immunantwort zu initiieren. Naive T-Zellen, die noch nie Kontakt mit einem Antigen gehabt haben, die aber einen Rezeptor haben, der zu einem Tumorantigen passt, werden mit den VOL-DCs interagieren und aktiviert. Sie reifen zu T-Helferzellen oder zu T-Killerzellen, vermehren sich, verlassen den Lymphknoten und suchen den ganzen Körper nach Tumorzellen ab. Haben sie bei einer Metastase die Tumorantigene wieder erkannt, werden die Tumorzellen dort attackiert. Danach patrouillieren tumorspezifische Gedächtniszellen im Körper und überwachen ihn weiterhin gegen Metastasenwachstum



## II.3 Kombinationsverfahren

### II.3.1 NDV-Vorbehandlung zur Verstärkung des Impferfolgs

Bevor Patienten am IOZK eine Immuntherapie erhalten, wird ihr Immunsystem gründlich untersucht und eventuell noch konditioniert, um einen optimalen Impferfolg zu erzielen. Die Konditionierung erfolgt eine Woche vor der Vakzination und besteht aus einer intravenösen Applikation des NDV. Diese Vorbehandlung hat mehrere positive Effekte:

- Durch Induktion von Interferon- $\alpha$  wird die Sekretion von TH2-Zytokinen (z. B. IL-4) unterdrückt und die T-Zellen werden in die gewünschte Richtung von TH1 polarisiert.
- Wenn das Virus auf Tumorzellen des Patienten trifft, kommt es zu dem oben genannten immunogenen Tumorzelltod.
- Es werden VOL-reaktive T-Helferzellen induziert. Diese Helferzellen werden in Analogie zu [32] bei der Vakzination mit VOL-DC an der Impfstelle rekrutiert und helfen bei der Aktivierung der antitumoralen Immunantwort.

Es konnte gezeigt werden, dass VOL-DCs sehr potent darin sind, autologe T-Zellen von Krebspatienten zu stimulieren. Im Vergleich zu DCs, die nur mit Tumorlysat (ohne NDV) beladen waren, wurden erhöhte Titer von Interferon- $\gamma$ , Interferon- $\alpha$  und von IL-15 gemessen [33].

### II.3.2 Kombination mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren

Neue Antikörper könnten die Effekte der Anti-Tumor-Vakzinationstherapie so verstärken, dass sie auch noch im metastasierten Tumorstadium wirksam sind. Gemeint sind die Checkpoint-Inhibitor-Antikörper PD-1 und PD-L1. Diese Antikörper zeigen nur eine Wirksamkeit, wenn das Immunsystem bereits gegen den Tumor reagiert und tumorinfiltrierende T-Zellen (TIL) gebildet hat. Ein von Tumorzellen ausgehendes Signal, genannt PD-1-Ligand, löst bei den TILs den programmierten Selbstmord (Apoptose) aus. Die oben genannten Antikörper blockieren die apoptoseinduzierende Signalvermittlung. Dadurch kann die tumorzerstö-

rende Immunantwort wieder ungehindert erfolgreich ablaufen [34].

Dass NDV in der Tat gut mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren zu kombinieren ist, wurde kürzlich in einer experimentellen Studie an B16-Maus-Melanomzellen gezeigt. Die intratumorale Applikation von NDV induzierte TILs nicht nur lokal, sondern auch in entfernten nicht injizierten Tumoraläsionen. Die nachfolgende Applikation von Anti-CTLA-4-Immun-Checkpoint-Inhibitoren führte zur Komplettremission auch der nicht injizierten Tumoren und zur Induktion einer protektiven antitumoralen Immunität [35].

### II.3.3 Kombination mit Radiofrequenzhyperthermie

Im fortgeschrittenen Tumorstadium steht in der Regel kein Tumormaterial zur Verfügung. Für solche Fälle steht die lokoregionale Radiofrequenzhyperthermie (RHT) in Kombination mit onkolytischer Virustherapie zur Verfügung. Die RHT fördert die Durchblutung des Tumorgewebes, wodurch die nachfolgend verabreichten Viren dort besser angereichert werden. Darüber hinaus werden einige Tumorzellen in Apoptose gehen oder Marker von Stress an der Zelloberfläche exprimieren. In Kombination mit den onkolytischen Viren werden neue Wege zur TAA-Präsentation *in situ* genutzt. Die lokale Hyperthermie (z. B. RHT) und auch die moderate Ganzkörperhyperthermie sind für gesunde Zellen schonende Therapieverfahren und damit Nebenwirkungsarm.

Zwei Fallbeispiele mögen die Kombinationstherapien am IOZK veranschaulichen:

1. Bei einem 75-jährigen Patienten mit progressivem, hormonrefraktärem Prostatakarzinom und extensiven Knochenmetastasen, bei dem vorher Standardtherapien erfolglos angewendet worden waren, konnte eine Langzeitremission (> 10 Jahre) erzielt werden. Die Behandlung beinhaltete die mehrfache Gabe von NDV in Kombination mit lokaler Hyperthermie und die 5-malige Impfung mit VOL-DC über einen Zeitraum von einem halben Jahr [36].
2. Eine ähnliche Therapie wurde bei einer 70-jährigen Patientin mit invasivem duktalem Brustkrebs und pri-

mären Lebermetastasen angewendet. Nach der chirurgischen Entfernung des Primärtumors wiesen Ultraschalluntersuchungen auf die Existenz von mindestens 6 Lebermetastasen hin, was später durch Biopsien bestätigt wurde. Die Patientin lehnte eine konventionelle Chemotherapie ab und bevorzugte eine Immun- und Virotherapie. Bei dieser Patientin konnte die Entwicklung einer tumorspezifischen T-Zell-Immunität durch ELISPOT nachgewiesen werden. Dieser Test eignete sich auch hervorragend als Verlaufskontrolle. Die Behandlung wurde gut vertragen und die Patientin lebt bis heute (> 5 Jahre) ohne ihren Lebensstil eingeschränkt zu haben. Die Lebermetastasen sind zwar nicht beseitigt, stehen aber wahrscheinlich unter Immunkontrolle. Damit konnte ein recht stabiler Dauerzustand erreicht werden [37].

## III. Durchbrechen von Therapieresistenzen

Viele Charakteristika von onkolytischen NDV weisen darauf hin, dass dieses biologische Agens das Potenzial besitzt, verschiedene Arten von Therapieresistenz bei Tumoren zu durchbrechen. Im Gegensatz zu Chemotherapie (CT) und Radiotherapie (RT) ist die Wirksamkeit des Virus nicht davon abhängig, dass die Krebszelle sich in Zellteilung befindet (proliferiert). DNA-Replikation und Zellteilung sind keine Voraussetzung für die Virusreplikation, da es sich um ein RNA-Virus handelt, das im Zytoplasma unabhängig von der DNA repliziert. Das Virus repliziert auch in mit 200 Gy bestrahlten Krebszellen und führt sie in einen immunogenen Zelltod.

Tumorzellen, die sich im Ruhezustand befinden und nicht teilen, wie z. B. Tumorstammzellen, metastaseninduzierende Zellen oder Tumorzellen im Zustand von „tumor dormancy“ sind in der Regel gegenüber CT oder RT resistent. Sie könnten aber sehr wohl ein geeignetes Ziel für eine onkolytische Virustherapie mit NDV sein.

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass NDV sich besonders gut in apoptoseresistenten [38], sowie in hypo-

**Tab. 3** Beispiele, wie onkolytisches NDV in der Krebsbehandlung eingesetzt werden kann

1. Als Einzelagens zur Onkolyse Applikationsarten: intratumoral, lokoregional oder systemisch
2. Zur Immunkonditionierung: Induktion von Interferonen und Zytokinen, Herunterregulation von regulatorischen T-Zellen, TH1-Polarisierung Applikationsart: systemisch
3. Als Adjuvans und Gefahrensignalvermittler in einer Antitumorvakzine: Stimulation von tumorantigenspezifischen T-Helfer- und T-Killerzellen, Etablierung von spezifisch antitumoralem immunologischem Gedächtnis (Beispiele ATV-NDV und VOL-DC) Applikationsart: intradermal
4. Als viraler Vektor zum Transfer therapeutischer Gene Applikationsart: intratumoral, lokoregional oder systemisch
5. Zum Durchbrechen von Therapieresistenzen in Kombination mit anderen Therapien, wie Chemo-, Strahlen- oder Immuntherapie (z. B. Checkpoint-Inhibitoren) Applikationsart: intratumoral, lokoregional oder systemisch

xischen [39] oder auch in interferonresistenten [40] Tumorzellen vermehren, was eine Onkolyse und ICD zur Folge hat.

NDV besitzt auch die Fähigkeit zu einer zielgerichteten Therapie gegen Glioblastoma multiforme (GBM). Das Virus interagiert mit der PI3K-Rho GTPase Rac1, die für die Lamellipodienbildung und Invasion von GBM-Zellen wichtig ist. Dadurch kommt es zur Virusinfektion, zur Syncytium-Induktion und zur Aktinreorganisation als Teil des viralen Replikationsprozesses. Eine NDV-Infektion könnte somit zur Inhibition von GBM-Proliferation und Invasion führen [41].

Schließlich scheint NDV auch geeignet zu sein, Resistenzen gegenüber Immuntherapien zu durchbrechen. Es wurde gezeigt, dass es in der Lage ist, die T-Zell-Toleranz gegenüber Tumorzellen zu durchbrechen [42]. Auch die Resistenz gegen eine Immun-Checkpoint-Blockade konnte durch NDV durchbrochen werden [35].

Onkolytisches NDV hat daher das Potenzial, verschiedene Arten von Barrieren zwischen einem Tumor und dem tumortragenden Organismus zu überwinden. Dies geschieht durch Aktivierung von Immunabwehrmechanismen einerseits und durch Tumorzellzerstörung mit assoziiertem ICD andererseits.

In **Tab. 3** sind fünf verschiedene Strategien, wie onkolytisches NDV in der Krebsbehandlung eingesetzt werden kann, zusammengefasst.

#### IV. Schlussfolgerungen und Ausblick

Apoptotische Zellen galten seit langem als tolerogen und nicht in der Lage, Immunantworten gegen zellassozierte Antigene auszulösen. In jüngster Zeit hat ein Paradigmenwechsel stattgefunden, indem gezeigt werden konnte, dass onkolytische Viren und andere Stimuli eine andere Form von Apoptose auszulösen vermag, die vom adaptiven Arm des Immunsystems wahrgenommen wird. Diese immunogene Apoptose ist ein Teil des immunogenen Tumorzelltods (ICD), zu dem auch Prozesse wie Autophagie und Nekrose/Nekroptose gehören. ICD hat profunde klinische und therapeutische Implikationen, insbesondere bei Immuntherapien. Es ist von daher logisch, Tumorzellen entsprechend den Erkenntnissen von ICD zu entwickeln. Die Ergebnisse zweier solcher Impfstoffe, ATV-NDV und VOL-DC, wurden vorgestellt.

Mit der Kombination von dendritischen Zellen, Tumorantigenen und Viren hat sich das IOZK ein unverwechselbares Profil geschaffen. Bezüglich zukünftiger Entwicklungen kann festgestellt werden, dass in gewissem Sinne die Zukunft schon begonnen hat. Die Einführung von checkpointinhibitorischen Antikörpern hat in klinischen Studien Langzeitüberlebensverbesserungen erbracht, wie es von herkömmlichen Therapieverfahren bisher nicht bekannt war. Ein DC-Impfstoff wurde bereits zugelassen und T-Zell-basierte Immuntherapien werden in Zukunft noch mehr Aufmerksamkeit erlangen. Auch die onkolytischen Viren werden eine Rolle

spielen. Onkolytisches NDV konnte vom IOZK erstmalig nach GMP (dem höchsten Qualitätsstandard) hergestellt werden. Das Potenzial dieses Virus ist noch keinesfalls ausgeschöpft angesichts der Tatsache, dass dieses biologische Agens diverse Arten von Therapieresistenzen zu durchbrechen vermag.

#### Korrespondenzadresse

**Prof. Dr. V. Schirmmacher**  
IOZK – Immunologisch Onkologisches Zentrum  
Köln, Hohenstaufenring 30–32  
50674 Köln  
v.schirmmacher@web.de

#### Einhaltung ethischer Richtlinien

**Interessenkonflikt.** V. Schirmmacher gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine Studien an Menschen oder Tieren.

**Open Access** Dieser Artikel unterliegt den Bedingungen der Creative Commons Attribution License. Dadurch sind die Nutzung, Verteilung und Reproduktion erlaubt, sofern der/die Originalautor/en und die Quelle angegeben sind.

#### Literatur

1. Russel SJ, Peng KW, Bell JC (2012) Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 30:658–670
2. Elankumaran S, Rockemann D, Samal SK (2006) Newcastle disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death. *J Virol* 80:7522–7534
3. Liu TC, Galanis E, Kirn D (2007) Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol* 4:101–117
4. Atherton MJ, Lichty BD (2013) Evolution of oncolytic viruses: novel strategies for cancer treatment. *Immunotherapy* 5(11):1191–1206
5. Csatory LK, Eckhardt S, Bukosza I et al (1993) Attenuated veterinary virus vaccine for the treatment of cancer. *Cancer Detec Prev* 17:619–627
6. Lorence RM, Katubig BB, Reichard KW et al (1994) Complete regression of human fibrosarcoma xenografts after local Newcastle disease virus therapy. *Cancer Res* 54:6017–6021
7. Schirmmacher V, Fournier P (2009) Newcastle disease virus: a promising vector for viral therapy, immune therapy, and gene therapy. *Methods Mol Biol* 542:565–605
8. Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM et al (2006) Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol Ther* 13(1):221–228
9. Cassel WA, Murray DR (1965) Newcastle disease virus as an antineoplastic agent. *Cancer* 7:863–868
10. Park MS, Garcia-Sastre A, Cros JF et al (2003) Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction. *J Virol* 77:9522–9532

11. Zamarin D, Palese P (2012) Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions. *Future Microbiol* 7(3):347–367
12. Lam HY, Yeap SK, Rasoli M et al (2011) Safety and clinical usage of Newcastle disease virus in cancer therapy. *J Biomed Biotechnol* 2011:718710
13. Fournier P, Schirmacher V (2013) Oncolytic Newcastle disease virus as cutting edge between tumor and host. *Biology (Basel)* 2:936–975
14. Kroemer G, Galuzzi I, Kepp O, Zitvogel I (2013) Immunogenic cell death in cancer therapy. *Ann Rev Immunol* 31:51–72
15. Schirmacher V, Fournier P (2014) Editorial: Harnessing oncolytic virus-mediated anti-tumor immunity. *Front Oncol* 4:337–338 (Ebook: <http://journal.frontiersin.org/researchtopic/1613>)
16. Washburn B, Schirmacher V (2002) Human tumor cell infection by Newcastle disease virus leads to upregulation of HLA and cell adhesion molecules and to induction of interferons, chemokines and finally apoptosis. *Int J Oncol* 21:85–93
17. Feuerer M, Beckhove P, Bai L et al (2001) Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow. *Nat Med* 7(4):452–458
18. Koks CA, Garg AD, Ehrhardt M et al (2015) Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death. *Int J Cancer* 136:E313–E325
19. Hotte SJ, Lorence RM, Hirte HW et al (2007) An optimized clinical regime for the oncolytic virus PV701. *Clin Cancer Res* 13(3):977–985
20. Fournier P, Arnold A, Wilden H, Schirmacher V (2012) Newcastle disease virus induces pro-inflammatory conditions and type I interferon for counter-acting Treg activity. *Int J Oncol* 40:840–850
21. Cassel WA, Murray DR (1992) A ten-year follow-up on stage II malignant melanoma patients treated post-surgically with Newcastle disease virus oncolysate. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 9(4):169–171
22. Schirmacher V, Haas C, Bonifer R et al (1999) Human tumor cell modification by virus infection: an efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle disease virus. *Gene Ther* 6:63–73
23. Schirmacher V, Fournier P, Schlag P (2014) Autologous tumor cell vaccines for post-operative active-specific immunotherapy of colorectal carcinoma: long-term patient survival and mechanism of function. *Expert Rev Vaccines* 13:117–130
24. Ahlert T, Sauerbrei W, Bastert G et al (1997) Tumor-cell number and viability as quality and efficacy parameters of autologous virus-modified cancer vaccines in patients with breast and ovarian cancer. *J Clin Oncol* 15:1354–1366
25. Steiner HH, Bonsanto MM, Beckhove P et al (2004) Antitumor vaccination of patients with glioblastoma multiforme: a pilot study to assess feasibility, safety, and clinical benefit. *J Clin Oncol* 22:4272–4281
26. Schirmacher V, Ahlert T, Pröbstle T et al (1998) Immunization with virus-modified tumor cells. *Semin Oncol* 25:677–696
27. Schulze T, Kemmner W, Weitz J et al (2009) Efficiency of adjuvant active specific immunization with Newcastle disease virus modified tumor cells in colorectal cancer patients following resection of liver metastases: results of a prospective randomized trial. *Cancer Immunol Immunother* 58(1):61–69
28. Vermorken JB, Claessen AM, van Tinteren H et al (1999) Active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer: a randomized trial. *Lancet* 353(9150):345–350
29. Fournier P, Schirmacher V (2013) Bispecific antibodies and trispecific immunocytokines for targeting the immune system against cancer: preparing for the future. *BioDrugs* 27:35–53
30. Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F et al (2013) Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic dendritic cells. *Front Immunol* 4:82. doi:10.3389/fimmu.2013.00082
31. Zaslavsky E, Hershberg U, Seto J et al (2010) Antiviral response dictated by choreographed cascade of transcription factors. *J Immunol* 184:2908–2917
32. Mitchell DA, Batich KA, Gunn MD et al (2015) Teatanus toxoid and CCL3 improve dendritic cell vaccines in mice and glioblastoma patients. *Nature* 519:366–369
33. Bai L, Koopmann J, Fiola C et al (2002) Dendritic cells pulsed with viral oncolysates potently stimulate autologous T cells from cancer patients. *Int J Oncol* 21:685–694
34. Pardoll DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12:252–264
35. Zamarin D, Holmgaard RB, Subudhi SK et al (2014) Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy. *Sci Transl Med* 6:226–232
36. Schirmacher V, Bihari AS, Stücker W, Sprenger T (2014) Long-term remission of prostate cancer with extensive bone metastases up immunotherapy: a case report. *Oncol Lett* 8:2403–2406
37. Schirmacher V, Stücker W, Lulei M et al (2015) Long-term survival of a breast cancer patient upon immune and virotherapy: a case report. *Immunother* 28:1–6
38. Mansour M, Palese P, Zamarin D (2011) Oncolytic specificity of Newcastle disease virus is mediated by selectivity for apoptosis-resistant cells. *J Virol* 85(12):6015–6023
39. Ch'ng WC, Stanbridge EJ, Yusoff K, Shafee N (2013) The oncolytic activity of Newcastle disease virus in clear cell carcinoma cells in normoxic and hypoxic conditions: the interplay between VHL and interferon- $\beta$  signaling. *J Interferon Cytokine Res* 33:346–354
40. Fiola C, Peeters B, Fournier P et al (2006) Tumor selective replication of Newcastle disease virus: association with defects of tumor cells in antiviral defence. *Int J Cancer* 119(2):328–338
41. Abdullah JM, Mustafa Z, Ideris A (2014) Newcastle disease virus interaction in targeted therapy against proliferation and invasion pathways of Glioblastoma multiforme. *Biomed Res Int* 2014:386470. doi:10.1155/2014/386470 (Epub 2014 Aug 27)
42. Termeer CC, Schirmacher V, Bröcker EB, Becker JC (2000) Newcastle disease virus infection induces B7-1/B7-2-independent T-cell costimulatory activity in human melanoma cells. *Cancer Gene Ther* 7:316–323