

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

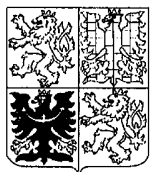
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 2933

(13) Druh dokumentu: **A3**

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.02.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.02.1997 18.02.1997**
18.02.1997 18.02.1997
18.02.1997 28.05.1997

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/801285 1997/801681**
1997/801755 1997/801765
1997/038065 1997/047834

(33) Země priority: **US US US US US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.03.2000**
(Věstník č. 3/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/03514**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/35554**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 38/00

A 61 K 31/70

A 61 K 31/655

(71) Přihlašovatel:

CANJI, INC., San Diego, CA, US;

(72) Původce:

Nielsen Loretta, Millington, NJ, US;
Horowitz Jo Ann, Kenilworth, NJ, US;
Maneval Daniel C., San Diego, CA, US;
Demers William G., San Diego, CA, US;
Rybak Mary Ellen, Warren, NJ, US;
Resnick Gene, Scarsdale, NY, US;

(74) Zástupce:

Guttmann Michal JUDr. Ing., Nad Štolou 12,
Praha 7, 170 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Kombinovaná terapie tumor-supresorovým
gelem a chemoterapie při léčbě nádorových
onemocnění

(57) Anotace:

Způsoby ošetření savčích nádorových nebo hyperproliferativních buněk, které obsahují kontaktování buněk s tumor-supresorovým proteinem nebo s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou a také kontaktování buněk s alespoň jedním adjuvančním protinádorovým činidlem. Farmaceutické prostředky, které obsahují tumor-supresorový protein nebo tumor-supresorovou nukleovou kyselinu a alespoň jedno adjuvanční protinádorové činidlo a kity pro léčbu savčích nádorových nebo hyperproliferativních buněk.

Kombinovaná terapie tumor-supresorovým genem a chemoterapie při léčbě nádorových onemocnění

Oblast techniky

Předkládaný vynález popisuje nové způsoby léčby subjektů postižených hyperproliferativním onemocněním jako jsou nádory nebo metastatická onemocnění. Přesněji, vynález obsahuje způsob pro inhibici hyperproliferace buněk, přesněji nádorových buněk, který obsahuje kombinované použití tumor-supresorového genu nebo produktu tohoto genu a protinádorového činidla.

Dosavadní stav techniky

Chromosomální abnormality jsou často spojeny s genetickými chorobami, degenerativními chorobami a nádory. Konkrétně, delece nebo multiplikace kopií celých chromosomů nebo chromosomálních segmentů a vyšší úroveň amplifikace specifických regionů genomu se často vyskytují u nádorů. Viz například Smith (1991), Breast Cancer Res. Treat., 18: Suppl. 1: 5-14; Van den Viler (1991) Became. Beefiest. Acta. 1072: 33-50; Sato (1990) Cancer Res. 50: 7184-7189. Skutečně, amplifikace DNA sekvencí obsahujících protoonkogeny a delece DNA sekvencí obsahujících tumor-supresorové geny jsou častými rysy tumorogenese. Dutrillaux (1990) Cancer Genet. Cytogenet. 49: 203-217.

Mutace p53 genu je nejčastější genetickou alterací u lidských nádorů (Bartek (1991) Oncogene 6: 1699-1703; Hollstein (1991) Science 253: 49-53). Kromě toho, vložení přirozeného p53 do savčích nádorových buněk postrádajících endogenní přirozený p53 protein potlačuje neoplastický fenotyp těchto buněk (viz například U.S. patent č. 5532220).

Z mnoha dostupných chemoterapeutických léků vzbudil paclitaxel, komerčně dostupný jako Taxol® (NSC č. 125973) zájem, protože je účinný v klinických pokusech proti nádorům resistantním na cytostatika, včetně nádorů ovaria a prsu (Hawkins (1992) *Oncology* 6: 17-23; Horwitz (1992) *Trends Pharmacol. Sci.* 13: 134-146; Rowinsky (1990) *J. Natl. Canc. Inst.* 82: 1247-1259). Poslední studie týkající se interakcí mezi paclitaxelem a terapií tumor-supresorovým genem ukázaly, že redukováné hladiny tumor-supresorového genu (t.j. p53) korelují s vyšším arestem v G2/M fázi, s mikroenukleací a s paclitaxelem indukovanou apoptosou nezávislou na p53. Oproti tomu, přežívání buněk s intaktním p53, které prošly mitosou a přechodně se akumulovaly v následné G1 fázi, korelovalo se zvýšením hladin proteinů p53 a p21^{cipl.waf1} (Wahl (1996) *Nature Med.* 2:72-79). Podobně, Hawkins (1996) *Cancer Res.* 56: 892-898, ukázal, že inaktivace p53 zvyšuje sensitivitu na některá antimitotická činidla, včetně paclitaxelu. Autoři naznačili, že p53 může mít funkci v opravách DNA, a tak může umožňovat snadnější přechod buněk S fází I v přítomnosti léků. Tyto studie proto naznačují, že terapie tumor-supresorovým genem a cytostatická terapie antimitotickými činidly (zejména terapie paclitaxelem) má protichůdné účinky.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález obsahuje způsob pro léčbu hyperproliferativních savčích buněk. Vynález je částečně založen na překvapivém zjištění, že současná cytostatická terapie v kombinaci s terapií tumor-supresorovým genem (např. p53) umožňuje vyšší účinek v inhibici proliferace neoplastických nebo jiných buněk s deficitem tumor-supresorové aktivity.

Tak obsahuje vynález v jednom provedení způsoby pro léčbu nádorových nebo hyperproliferativních buněk, které obsahují kontaktování buněk s tumor-supresorovým proteinem nebo s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou a s alespoň jedním adjuvantním protinádorovým činidlem. V některých provedeních způsob obsahuje současné podání tumor-supresorového proteinu nebo tumor-supresorové nukleové kyseliny a adjuvantního protinádorového činidla s alespoň jedním cytostatickým činidlem. Například, tumor-supresorová nukleová kyselina (například nukleová kyselina kodující p53) může být podána společně s adjuvantním protinádorovým činidlem (například paclitaxelem) a činidlem způsobujícím poškození DNA, jako je cis-platina, karbo-platina, navelbin (vinorelbin-tartrat).

Nádorové nebo hyperproliferativní buňky jsou často neoplastické buňky. Pokud jsou buňky přítomny v nádoru, tak způsob podle předkládaného vynálezu inhibuje růst nádoru a tak umožňuje léčbu nádoru. Mezi takové nádory patří - bez omezení - karcinom ovaria, karcinom slinivky břišní, nemalobuněčný karcinom plic, malobuněčný karcinom plic, hepatocelulární karcinom, melanom, retinoblastom, karcinom prsu, kolorektální karcinom, leukemie, lymfomy, mozkové nádory, karcinom čípku děložního, sarkomy, karcinom prostaty, karcinom močového měchýře, nádory retikuloendotelu, Wilmsův tumor, astrocytom, glioblastom, neuroblastom, osteosarkom, nádor ledvin a nádory hlavy a krku.

Výhodným adjuvantním protinádorovým činidlem je paclitaxel nebo derivát paclitaxelu a výhodnou tumor-supresorovou nukleovou kyselinou je nukleová kyselina kodující tumor-supresorový protein vybraný ze skupiny skládající se z p53 proteinu a jeho analogů a retinoblastomového (RB) proteinu.

Konkrétní výhodná tumor-supresorová nukleová kyselina koduje přirozený p53 protein a konkrétní výhodný retinoblastomový protein je p110^{RB} nebo p56^{RB}.

Tumor-supresorová nukleová kyselina je výhodně dopravena do cílových buněk pomocí vektoru. Takové virové vektory jsou modifikované technikou rekombinantní DNA tak, aby umožňovaly expresi tumor-supresorové nukleové kyseliny v cílových buňkách. Tyto vektory mohou být odvozeny od vektorů nevirového (například plasmidového) nebo virového zdroje (například od adenovirovu, adeno-asociovaného viru, retroviru, herpes viru, viru vakcinie). Ve výhodném provedení vynálezu je vektorem rekombinantně modifikovaný adenovirový vektor. Nevirové vektory jsou výhodně v komplexu s činidly usnadňujícími přenos DNA přes buněčnou membránu. Příklady takových nevirových vektorových komplexů zahrnují prostředky s polykationtovými činidly, které usnadňují kondenzaci DNA a přenosové prostředky založené na lipidech. Příkladem přenosového prostředku založeného na lipidech je podání nukleových kyselin v liposomech.

Zejména vhodné adenovirové vektory (například pro podání nukleové kyseliny kodující přirozený p53 protein) obsahují částečné nebo úplné delece DNA pro protein IX. V jednom provedení je delece genové sekvence pro protein IX v rozsahu přibližně 3500 bp od 5' konce viru do přibližně 4000 bp od 5' konce viru. Vektor může také obsahovat delecí neesenciální DNA sekvence v adenovirovém časném regionu 3 a/nebo v adenovirovém časném regionu 4 a v jednom provedení je delecí delece DNA sekvence Ela a/nebo Elb. Zejména výhodný rekombinantní adenovirový vektor pro přenos lidské cDNA pro p53 obsahuje hlavní pozdní promotor adenoviru typu 2 nebo lidský CMV promotor a trojitě vedoucí cDNA adenoviru typu 2. Jedním takovým výhodným adenovirovým vektorem je ACN53.

Výhodným paclitaxelem nebo derivátem paclitaxelu je paclitaxel a/nebo Taxotere^R, a nejvýhodnější je paclitaxel (Taxol^R). Jiným výhodným adjuvantním protinádorovým činidlem je Epothilon. V jednom výhodném provedení vynálezu je tumor-supresorovým činidlem A/C/N/53 a adjuvantním protinádorovým činidlem je paclitaxel.

Tumor-supresorový protein nebo tumor-supresorová nukleová kyselina mohou být dispergovány ve farmaceuticky přijatelné přísadě. Podobně může být adjuvantní protinádorové činidlo (například paclitaxel) dispergováno ve farmaceuticky přijatelné přísadě. Tumor-supresorový protein a tumor-supresorová nukleová kyselina a uvedený paclitaxel nebo derivát paclitaxelu mohou být dispergovány v jednom prostředku (obsahujícím jedno nebo více pomocných činidel).

Tumor-supresorový protein nebo tumor-supresorová nukleová kyselina a/nebo adjuvantní protinádorové činidlo mohou být podány intraarteriálně, intravenosně (například injekčně), intraperitoneálně a/nebo intratumorálně, současně nebo sekvenčně. Výhodnými způsoby podání jsou podání do arteria hepatica, intraperitoneální podání, nebo při léčbě v oblasti hlavy (například při léčbě nádorů nervového systému) aplikace do arteria carotis.

Tumor-supresorový protein nebo tumor-supresorová nukleová kyselina mohou být podány v jedné dávce nebo může léčba obsahovat více dávek, například v časovém rozmezí alespoň 6 hodin, lépe alespoň tři podání v odstupu přibližně 24 hodin.

V jiném výhodném provedení je tumor-supresorový protein nebo tumor-supresorová nukleová kyselina podána (s nebo bez

adjuvantního protinádorového činidla) v celkové dávce v rozmezí od přibližně 1×10^9 do přibližně 1×10^{14} , nebo přibližně 1×10^9 až přibližně $7,5 \times 10^{15}$, výhodně v dávce přibližně 1×10^{11} až přibližně $7,5 \times 10^{13}$ adenovirových částic, v jednom z následujících léčebných režimů: celá dávka v jedné dávce, celá dávka podaná denně během 5 dnů, celá dávka podaná denně během 15 dnů a celá dávka podaná denně během 30 dnů. Dávka může být také podávána kontinuálně po dobu 1 až 30 dnů. Paclitaxel nebo derivát paclitaxelu je podán v celkové dávce v rozmezí od 75-350 mg/m² během 1 hodiny, 3 hodin, 6 hodin nebo 24 hodin v jednom z následujících léčebných režimů: podání v jedné dávce, celková dávka podávána denně v den 1 a 2, celková dávka podávána denně v den 1, 2 a 3, celková dávka podaná v 15 dnech, celková dávka podaná ve 30 dnech, denní kontinuální infuse podobu 15 dnů, denní kontinuální infuse podobu 30 dnů. Výhodná dávka je 100-250 mg/m² během 24 hodin. Alternativně může být paclitaxel nebo derivát paclitaxelu podáván jednou týdně v dávce 60 mg/m². Tento způsob podání může být opakován ve dvou nebo více cyklech (nejlépe ve třech cyklech) a cykly jsou podány s odstupem tří až čtyř týdnů.

V některých výhodných provedeních může být denní dávka $7,5 \times 10^9$ až přibližně $7,5 \times 10^{15}$, lépe přibližně 1×10^{12} až přibližně $7,5 \times 10^{13}$ adenovirových částic podána každý den po dobu až 30 dnů (například režimy, ve kterých je stejná dávka podávána každý den po dobu 2 dnů, 2 - 5 - 14 - 30 dnů). Režimy opakovaného podání mohou být opakovány v cyklech s odstupem 21 až 28 dnů. Výhodnými způsoby podání jsou intraarteriální (například do arteria hepatica), intratumorální a intraperitoneální podání.

Pokud je tumor-supresorová nukleová kyselina (například p53) podána v adenovirovém vektoru s adjuvantním protinádorovým

činidlem (například paclitaxelem) a činidlem způsobujícím poškození DNA (jako je například cis-platina, karbo-platina nebo navelbin), tak je adenovirový vektor podáván po dobu 5-14 dnů v dávce přibližně $7,5 \times 10^{12}$ až přibližně $7,5 \times 10^{13}$ adenovirových částic na den. Pokud je adenovirový vektor a paclitaxel podán spolu s karbo-platinou, tak je dávka obvykle $7,5 \times 10^{13}$ adenovirových částic na den. Například, denní dávka $7,5 \times 10^{12}$ adenovirových částic může být použita pro podání do plic.

Vynález také obsahuje kity pro léčbu savčích hyperproliferativních nebo nádorových buněk. Kity obsahují zde popsaný tumor-supresorový protein nebo tumor-supresorovou nukleovou kyselinu (výhodně přirozený p53 protein nebo nukleovou kyselinu (například ve virovém nebo nevirovém vektoru) nebo retinoblastomový (RB) protein nebo nukleovou kyselinu); a adjuvantní protinádorové činidlo, jak je zde popsáno (například paclitaxel nebo derivát paclitaxelu) a/nebo volitelně jakékoliv jiné cytostatické činidlo, která jsou zde popsána. Kit může také obsahovat návod popisující podání jak tumor-supresorového proteinu nebo tumor-supresorové nukleové kyseliny, tak adjuvantního protinádorového činidla (a volitelně jiného cytostatického činidla) při inhibici růstu nebo proliferace nádorových nebo hyperproliferativních buněk. Konkrétní výhodný kit obsahuje A/C/N/53 a paclitaxel.

V jiném provedení obsahuje předkládaný vynález farmakologický prostředek obsahující tumor-supresorový protein nebo tumor-supresorovou nukleovou kyselinu a adjuvantní protinádorové činidlo. V různých provedeních může farmakologický prostředek dále obsahovat jakékoliv jiné zde popsané cytostatické sloučeniny. Konkrétní výhodný prostředek obsahuje nukleovou kyselinu pro p53 (například A/C/N/53) a

paclitaxel. Tumor-supresorová nukleová kyselina nebo tumor-supresorový protein a cytostatické činidlo (například paclitaxel) mohou být obsaženy v různých pomocných činidlech nebo v jednom pomocném činidlu, jak je zde uvedeno. Pokud je použito více pomocných činidel, pak mohou být smíseny dohromady, nebo mohou být uchovávány odděleně (například ve formě mikrokapslí).

V ještě jiném provedení obsahuje předkládaný vynález prostředek obsahující savčí nádorové nebo hyperproliferativní buňky, kde uvedené buňky obsahují exogenní tumor-supresorovou nukleovou kyselinu nebo tumor-supresorový protein. Buňky mohou dále obsahovat adjuvantní protinádorové činidlo jako je paclitaxel nebo derivát paclitaxelu. Exogenní tumor-supresorová nukleová kyselina nebo tumor-supresorový protein může být jeden nebo více z tumor-supresorových nukleových kyselin a/nebo tumor-supresorových proteinů, které jsou zde popsány. Podobně může být buňka jakákoliv jedna nebo více z hyperproliferativních a/nebo nádorových buněk, které jsou zde popsány.

V ještě jiném provedení obsahuje vynález způsob pro léčbu metastatických buněk. Způsob obsahuje kontaktování buněk s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou nebo tumor-supresorovým polypeptidem. Vhodná tumor-supresorová nukleová kyselina nebo tumor-supresorový polypeptid může být jedna nebo více z tumor-supresorových nukleových kyselin a/nebo tumor-supresorových polypeptidů, které jsou zde popsány. Způsob může dále obsahovat kontaktování buněk s jedním nebo více z adjuvantních protinádorových činidel, které jsou zde popsány. V zejména výhodném provedení způsob obsahuje lokální podání tumor-supresorové nukleové kyseliny a/nebo polypeptidu do chirurgické rány.

V jiném provedení vynález obsahuje zejména výhodný dávkovací režim. Tak v jednom provedení vynález obsahuje způsob pro léčbu savčích buněk, ve kterém je buňkám podána celková dávka tumor-supresorového proteinu nebo tumor-supresorové nukleové kyseliny, kde uvedená celková dávka je podána opakovaně se zvyšující se dávkou uvedeného tumor-supresorového proteinu nebo tumor-supresorové nukleové kyseliny. Výhodně jsou opakované dávky podány s odstupem alespoň 6 hodin. V jednom výhodném provedení jsou alespoň tři dávky podány s odstupem přibližně 24 hodin.

V jiném provedení vynález obsahuje způsob pro léčbu savčích buněk. V uvedeném způsobu léčby je buňkám podána celková dávka tumor-supresorového proteinu nebo tumor-supresorové nukleové kyseliny, kde uvedená celková dávka je podána opakovaně se zvyšující se dávkou uvedeného tumor-supresorového proteinu nebo tumor-supresorové nukleové kyseliny. Výhodně jsou opakované dávky podány s odstupem alespoň 6 hodin. Způsob by měl obsahovat podání alespoň tří zvyšujících se dávek a dávky mohou být podány denně. V jednom provedení může způsob obsahovat podání alespoň tří dávek s odstupem přibližně 24 hodin. V jiném provedení způsob obsahuje podání tumor-supresorové nukleové kyseliny v celkové dávce v rozmezí od přibližně 1×10^9 do přibližně $7,5 \times 10^{15}$, nebo od přibližně 1×10^{11} do přibližně $7,5 \times 10^{13}$, adenovirových částic v jednom z následujících léčebných režimů: celá dávka v jedné dávce, celá dávka podaná denně během 5 dnů, celá dávka podaná denně během 15 dnů a celá dávka podaná denně během 30 dnů. Způsob může dále obsahovat podání paclitaxelu nebo derivátu paclitaxelu v celkové dávce v rozmezí od 75-350 mg/m² během 24 hodin v jednom z následujících léčebných režimů: podání v jedné dávce, celková dávka podávána denně v den 1 a 2, celková dávka podávána denně v den 1, 2 a 3,

celková dávka podaná v 15 dnech, celková dávka podaná ve 30 dnech, denní kontinuální infuze podobu 15 dnů, denní kontinuální infuze podobu 30 dnů. Tento dávkovací režim může být opakován dvakrát nebo vícekrát a dva cykly mohou být podány s odstupem tří až 4 týdnů. Takto léčenými buňkami mohou být neoplastické buňky nádorů vybraných ze skupiny zahrnující karcinom ovaria, mesoteliom, karcinom slinivky břišní, nemalobuněčný karcinom plic, malobuněčný karcinom plic, hepatocelulární karcinom, melanom, retinoblastom, karcinom prsu, kolorektální karcinom, leukemie, lymfomy, mozkové nádory, karcinom čípku děložního, sarkomy, karcinom prostaty, karcinom močového měchýře, nádory retikuloendotelu, Wilmsův tumor, astrocytom, glioblastom, neuroblastom, osteosarkom, nádor ledvin a nádory hlavy a krku. Léčba vede k inhibici růstu nebo proliferace nádoru, jak je stanovena podle objemu nádoru.

Vynález také obsahuje farmakologické prostředky obsahující tumor-supresorový protein nebo tumor-supresorovou nukleovou kyselinu a alespoň jedno adjuvanční protinádorové činidlo. Adjuvančním protinádorovým činidlem může být paclitaxel nebo derivát paclitaxelu. Tumor-supresorový protein nebo tumor-supresorová nukleová kyselina mohou být vybrány ze skupiny zahrnující nukleovou kyselinu kodující přirozený p53 protein, nukleové kyseliny kodující retinoblastomový (RB) protein, přirozený p53 protein a retinoblastomový (RB) protein.

Retinoblastomový protein může být p110^{RB} nebo p56^{RB}. Nukleová kyselina může být obsažena v rekombinantním adenovirovém vektoru. Nukleová kyselina může být obsažena v rekombinantním adenovirovém vektoru obsahujícím částečnou nebo úplnou delecí DNA pro protein IX a obsahujícím nukleovou kyselinu kodující p53 protein. V jednom provedení je delece genové sekvence pro protein IX v rozsahu přibližně 3500 bp od 5' konce viru do

přibližně 4000 bp od 5' konce viru. Delece DNA může obsahovat sekvence označené Ela a Elb. Rekombinantní adenovirový vektor může dále obsahovat hlavní pozdní promotor adenoviru typu 2 nebo lidský CMV promotor, trojitou vedoucí cDNA adenoviru typu 2 a lidskou cDNA pro p53. Ve výhodném provedení je vektorem ACN53. Protinádorovým činidlem může být paclitaxel, derivát paclitaxelu nebo analog paclitaxelu.

Předkládaný vynález dále obsahuje prostředek obsahující savčí nádorové nebo hyperproliferativní buňky, kde uvedené buňky obsahují exogenní tumor-supresorovou nukleovou kyselinu nebo tumor-supresorový protein a adjuvantní protinádorové činidlo. Tumor-supresorová nukleová kyselina může být nukleová kyselina kodující tumor-supresorový protein vybraný ze skupiny obsahující přirozený p53 protein a retinoblastomový (RB) protein. Retinoblastomový protein může být p110^{RB} nebo p56^{RB}. Buňky mohou být přítomné u savců. Buňkami mohou být neoplastické buňky nádorů vybraných ze skupiny zahrnující karcinom ovaria, mesoteliom, karcinom slinivky břišní, nemalobuněčný karcinom plic, malobuněčný karcinom plic, hepatocelulární karcinom, melanom, retinoblastom, karcinom prsu, kolorektální karcinom, leukemie, lymfomy, mozkové nádory, karcinom čípku děložního, sarkomy, karcinom prostaty, karcinom močového měchýře, nádory retikuloendotelu, Wilmsův tumor, astrocytom, glioblastom, neuroblastom, osteosarkom, nádor ledvin a nádory hlavy a krku.

Vynález dále obsahuje způsob pro léčbu metastatických buněk, kde uvedený způsob obsahuje kontaktování buněk s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou nebo tumor-supresorovým polypeptidem a adjuvantním protinádorovým činidlem. Kontaktováním může být lokální podání tumor-supresorové nukleové kyseliny do chirurgické rány. Způsob může dále

obsahovat současné podání chemoterapeutického činidla, kterým může být cis-platina, karboplatina nebo navelbin.

Definice

Termín "adjuvantní protinádorové činidlo" označuje činidlo, které má alespoň jednu z následujících aktivit: schopnost modulovat tvorbu nebo funkci mikrotubulů, schopnost inhibovat aktivitu polyprenyl-protein transferasy, schopnost inhibovat angiogenesi, nebo schopnost inhibovat endokrinní aktivitu. Pomocná protinádorová činidla jsou podrobněji popsána dále. Jak je zde použit, nezahrnuje termín adjuvantní protinádorové činidlo sloučeniny způsobující poškození DNA.

"Tumor-supresorové geny" jsou nukleové kyseliny, pro které jsou mutace způsobující ztrátu funkce onkogenní. Proto absence, mutace nebo porušení normální exprese tumor-supresorového genu v jinak zdravé buňce zvyšuje pravděpodobnost nebo vede k maligní transformaci buňky. Naopak, pokud je funkční tumor-supresorový gen nebo protein přítomen v buňce, potlačuje jeho přítomnost tumorigenní, maligní nebo hyperproliferativní fenotyp buňky. Příklady tumor-supresorových nukleových kyselin podle této definice jsou - bez omezení - p110^{RB}, p56^{RB}, p53 a jiné tumor-supresorové sekvence, jak jsou popsány zde a v související patentové přihlášce USSN 08/328673, podané 25.10.1994. Tumor-supresorové nukleové kyseliny zahrnují tumor-supresorové geny a jejich subsekvence kodující aktivní fragmenty příslušného tumor-supresorového polypeptidu, stejně jako vektory obsahující takové sekvence.

"Tumor-supresorový polypeptid nebo protein" označuje polypeptid, který - pokud je přítomen v buňce - redukuje tumorigenní, maligní nebo hyperproliferativní fenotyp buňky.

Termín "virová částice" označuje intaktní virion. Koncentrace infekčních adenovirových virových částic je obvykle určena spektrofotometrickou detekcí DNA, jak je popsána, například, v Huyghe (1995) Human Gene Ther. 6: 1403-1416.

Termíny "neoplasie" nebo "neoplastický" popisují buňky rostoucí a/nebo dělicí se vyšší rychlostí, než je normální rychlost růstu pro daný typ buněk.

Termín "tumorigenicita" nebo "tumorigenní" označují schopnost tvorby nádorů nebo schopnost vyvolat tvorbu nádorů.

Termín "léčba buněk" označuje inhibici nebo zmírnění jednoho nebo více onemocnění vyvolaných přítomností chorobně změněných buněk. Při použití v souvislosti s nádorovými buňkami, t.zn. neoplastickými buňkami (například buňkami, kterým chybí endogenní přirozený tumor-supresorový protein) označuje termín "léčba buněk" zmírnění nebo eliminaci neoplastického fenotypu. Typicky vede taková léčba k inhibici (redukci nebo zpomalení růstu a/nebo proliferace) buněk ve srovnání se stejnými buňkami za stejných podmínek, ale bez léčby (například adjuvantním protinádorovým činidlem a/nebo tumor-supresorovou nukleovou kyselinou nebo polypeptidem). Taková inhibice může zahrnovat buněčnou smrt (například apoptosu). Při použití v souvislosti s nádory označují tyto termíny inhibici růstu nebo proliferace nádoru (jak je například stanoven měřením objemu). Taková inhibice může být způsobena redukcí rychlosti růstu a/nebo rychlostí proliferace a/nebo smrtí buněk v nádoru. Inhibice růstu nebo inhibice proliferace může být doprovázena změnou buněčného fenotypu (například obnovením morfologie charakteristické pro zdravé buňky, obnovením kontaktní inhibice, ztrátou invazivního fenotypu, inhibicí růstu

nezávislého na zakotvení buněk atd.). Pro účely tohoto vynálezu budou mít chorobné buňky jeden nebo více patologických rysů. Těmito rysy může být, mimo jiné, defektní exprese jednoho nebo více tumor-supresorových proteinů. Defektní exprese může být charakterizována kompletní ztrátou jednoho nebo více funkčních tumor-supresorových proteinů nebo redukcí exprese ztrátou jednoho nebo více funkčních tumor-supresorových proteinů. Takové buňky jsou často neoplastické a/nebo tumorigenní.

Termín "systémové podání" označuje podání prostředku nebo léku, jako jsou rekombinantní adenovirové vektory podle předkládaného vynálezu nebo pomocná protinádorová nebo cytostatická činidla podle předkládaného vynálezu, takovým způsobem, který vede k dopravení prostředku nebo léku do cirkulace. Termín "regionální podání" označuje podání prostředku nebo léku do určitého anatomického prostoru, jako je podání intraperitoneální, intrathekální, subdurální nebo podání do určitého orgánu, a podobně. Například, regionálním podáním je podání prostředku nebo léku do arteria hepatica pro regionální podání do jater. Termín "lokální podání" označuje podání prostředku nebo léku do určitého omezeného nebo ohraničeného anatomického prostoru, jako je intranádorová injekce do nádoru, subkutánní injekce, intramuskulární injekce a podobně. Odborníkům v oboru bude jasné, že lokální podání nebo regionální podání může také vést ke vstupu prostředku nebo léku do systémové cirkulace.

Termín "redukováná tumorigenicita" označuje přeměnu hyperproliferativních buněk (například neoplastických) na buňky s nižší proliferativní aktivitou. V případě nádorových buněk označuje termín "redukováná tumorigenicita" nádorové buňky, které se staly méně tumorigenními nebo netumorigenními nebo nenádorovými a jejichž schopnost přeměny na nádorové buňky je

snížena nebo eliminována. Buňky s redukovanou tumorigenicitou ani netvoří nádory in vivo, ani nemají prodloužený lag čas v řádech týdnů až měsíců před objevem nádorového růstu in vivo. Buňky s redukovanou tumorigenicitou mohou také způsobit pomalejší objemový růst nádoru ve srovnání se stejným typem buněk, které mají plně inaktivovaný nebo nefunkční tumor-supresorový gen a které jsou kultivované za stejných fyziologických podmínek (například při stejné tkáni, věku organismu, pohlaví organismu, době menstruačního cyklu atd.).

Jak je zde použit, znamená termín "aktivní fragment" genu nebo polypeptidu menší úseky (subsekvence) genu nebo nukleové kyseliny odvozené z genu (například cDNA), které si uchovávají schopnost kodovat proteiny mající tumor-supresorovou aktivitu. Obdobně, aktivní fragment polypeptidu označuje subsekvence polypeptidu tumor-supresorového proteinu. Jedním příkladem je aktivní fragment p56^{RB}, který je popsán například v související USSN 08/328673, podané 25.10.1994.

Termín "malignita" popisuje tumorigenní buňky mající schopnost metastazovat.

Termín "nukleové kyseliny" označuje DNA nebo RNA. Nukleové kyseliny mohou obsahovat také modifikované nukleotidy, které umožňují správné čtení DNA polymerasou a které nemění expresi polypeptidu kodovaného nukleovou kyselinou.

Termín "nukleotidová sekvence" zahrnuje jak kodující, tak protismyslné řetězce, jak ve formě samostatných řetězců, tak ve formě duplexu.

Termín "DNA sekvence" označuje jednořetězcovou nebo dvouřetězcovou DNA molekulu složenou z nukleotidových bazí, adenosinu, thymidinu, cytosinu a guanosinu.

Termín "sekvence nukleové kyseliny kodující" označuje nukleovou kyselinu, která řídí expresi specifického proteinu nebo peptidu. Mezi sekvence nukleové kyseliny patří jak DNA sekvence, která je transkribována na RNA, tak RNA sekvence, která je translatována na protein. Sekvence nukleové kyseliny zahrnuje jak kompletní sekvence nukleové kyseliny, tak nekompletní sekvence nukleové kyseliny získané z kompletních sekvencí. Mělo by být dále jasné, že sekvence zahrnují degenerované kodony přirozených sekvencí nebo sekvence, které mohou být vloženy pro získání přednostních kodonů pro specifické hostitelské buňky.

Termín "expresní kazeta" označuje nukleotidové sekvence, které mohou ovlivňovat expresi strukturálního genu v hostitelích, kteří jsou kompatibilní s takovými sekvencemi. Takové kazety obsahují alespoň promotory a volitelně signální sekvence pro ukončení transkripce. Další faktory nezbytné pro nebo vhodné pro ovlivnění exprese mohou být také obsaženy, jak je podrobněji popsáno dále.

Termín "operativně navázaný" označuje vazbu promotoru proti směru kodující sekvence vzhledem k DNA sekvenci, takže může promotor zprostředkovat transkripci DNA sekvence.

Termín "izolovaná" nebo "významně přečištěná", jak je použit ve vztahu k sekvencím nukleových kyselin kodujících tumor-supresorový protein nebo polypeptid nebo jeho fragmenty označuje izolované nukleové kyseliny, které nekodují jiné

proteiny nebo peptidy než tumor-supresorový protein nebo polypeptid nebo jeho fragment.

Termín "rekombinantní" označuje DNA, která byla izolována z přirozeného nebo endogenního zdroje a která byla modifikována chemicky nebo enzymaticky tak, že došlo k deleci přirozených sousedních nukleotidů nebo tak, že byly vloženy sousedící nukleotidy, které se přirozeně nevyskytují. Sousedící nukleotidy jsou ty nukleotidy, které jsou buď ve směru, nebo proti směru kodující sekvence od popsané sekvence nebo subsekvence nukleotidů.

Termín "vektor" označuje nukleovou kyselinu, která může infikovat, transfektovat, přechodně nebo trvale transformovat buňku. Je známo, že vektorem může být holá nukleová kyselina nebo nukleová kyselina v komplexu s proteinem nebo lipidem. Vektor volitelně obsahuje virové nebo bakteriální nukleové kyseliny a/nebo proteiny a/nebo membrány (například buněčnou membránu, virový lipidový obal a podobně). Je známo, že vektory často obsahují expresní kazetu, která umísťuje požadovanou nukleovou kyselinu pod kontrolu promotoru. Vektory zahrnují, ale nejsou omezeny na, replikony (například plasmidy nebo bakteriofágy), na které mohou být fragmenty DNA připojeny a replikovány. Vektory tak zahrnují, bez omezení, RNA, autonomní samoreplikující se cirkulární DNA (plasmidy) a zahrnují jak expresní, tak neexpresní plasmidy. Pokud je uvedeno, že rekombinantní mikroorganismus nebo buněčná kultura je hostitelem "expresního vektoru", tak to znamená, že buď extrachromosomální cirkulární DNA nebo DNA byla vložena do chromosomu hostitele. Pokud je vektor uchováván v hostitelské buňce, tak může být buď stabilně replikován buňkou během mitosy jako autonomní struktura, nebo je inkorporován do genomu hostitele.

Termín "účinné množství" označuje takové množství vektoru nebo léčiva, které je účinné v kontrole růstu a/nebo proliferace buněk.

Zkratka "C.I.U." označuje "buněčné infekční jednotky". Hodnota C.I.U. je vypočítána měřením buněk pozitivních na virový hexon protein (například 293 buněk) po 48 hodinovém infekčním období (Huyghe (1995) Human Gene Ther. 6: 1403-1416).

Zkratka "m.o.i." znamená "mohutnost infekce" a je uvedena v C.I.U. na buňku.

Termín "paclitaxel" označuje lék, který je komerčně dostupný jako Taxol^R. Taxol^R inhibuje replikaci eukaryotických buněk zvýšením polymerizace tubulinových skupin ve stabilizovaných svazcích mikrotubulů, které potom nejsou schopné reorganizace na správné struktury nutné pro mitosu.

Termín "kontaktování buněk" v souvislosti s kontaktováním s lékem a/nebo nukleovou kyselinou označuje kontaktování provedené tak, že lék a/nebo nukleová kyselina je internalizován do buňky. V tomto významu je kontaktování buněk s nukleovou kyselinou ekvivalentní transfekci buněk nukleovou kyselinou. Pokud je lék lipofilní nebo pokud je nukleová kyselina v komplexu s lipidem (například kationtovým lipidem), tak prosté kontaktování vede k transportu (aktivnímu, pasivnímu a/nebo difusi) do buňky. Alternativně mohou být lék a/nebo nukleová kyselina samotné, nebo v kombinaci s nosičem, aktivně transportovány do buněk. Například, pokud je nukleová kyselina přítomna v infekčním vektoru (např. adenoviru), tak může vektor zprostředkovat vychytávání nukleové kyseliny buňkou. Nukleová kyselina může být v komplexu s činidly, která specificky

interagují s extracelulárními receptory pro usnadnění přenosu nukleové kyseliny do buněk, jak je tomu například v komplexech ligand/polykationt/DNA, které jsou popsány v U.S. patentech č. 5166320 a 5635383. Dále, virový přenos může být zesílen rekombinantní modifikací klubkových nebo vláknových domén virového genomu tak, aby obsahovaly cílové skupiny buněk.

Konstrukty označené "A/C/N/53" a "A/M/N/53", p110^{RB}, p56^{RB} označují konstrukty takto označené v souvisejících přihláškách USSN 08/328673, podané 25.10.1994 a v Mezinárodní patentové přihlášce WO 95/11984.

Termín "konzervativní substituce", jak je použit v souvislosti s proteiny, označuje změnu v aminokyselinovém složení proteinu, která významným způsobem nemění aktivitu proteinu. Tak označuje termín "konzervativně modifikované variace" určité aminokyselinové substituce takových aminokyselin, které nejsou zásadní pro aktivitu proteinu nebo substituce takovými aminokyselinami, které mají podobné vlastnosti (například acidických, bazických, pozitivně nebo negativně nabitých, polárních nebo nepolárních atd.), takže i substituce zásadních aminokyselin významným způsobem nemění aktivitu. Tabulky konzervativních substitucí obsahujících funkčně podobné aminokyseliny jsou v oboru dobře známe. Například, každá ze šesti následujících skupin obsahuje aminokyseliny, které jsou navzájem konzervativní:

- 1) alanin (A), serin (S), threonin (T);
- 2) kyselina asparagová (D), kyselina glutamová (E);
- 3) asparagin (N), glutamin (Q);
- 4) arginin (R), lysin (K);
- 5) isoleucin (I), leucin (L), methionin (M), valin (V); a
- 6) fenylalanin (F), tyrosin (Y), tryptofan (W).

Viz též Creighton (1984), Proteins, W.H. Freeman and Company. Dále, jednotlivé substituce, delece nebo adice, které alterují, přidávají nebo deletují jednu aminokyselinu nebo malé procento aminokyselin v kodované sekvenci, jsou také považovány za "konzervativně modifikované variace".

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr. 1 ukazuje in vitro inhibici SK-OV-3 buněk ovariálního nádoru různými koncentracemi p53 (A/C/N/53) a/nebo Taxolu^R.

Obr. 2 je isobologram pro pokus uvedený na obr. 1. Byl pozorován synergismus mezi Taxolem^R a p53 (A/C/N/53), když byly buňky vystaveny působení Taxolu^R 24 hodin před léčbou p53.

Obr. 3a, 3b a 3c ilustrují účinnost p53 Ad na xenotransplantáty lidského karcinomu prsu na holých myších. Myším byla podána celková dávka $2,2 \times 10^9$ C.I.U. adenoviru (A/C/N/53 nebo Ad) na myš v 10 injekcích ve dny 0-4 a 7-11. Myši byly ošetřeny p53 Ad, β -gal Ad nebo vehikulem samotným. Obr. 3a ilustruje výsledky při použití nádorů MDA-MB-231. Obr. 3b ilustruje výsledky při použití nádorů MDA-MB-468 (-468). Obr. 3c ilustruje výsledky při použití nádorů MDA-MB-435 (-435).

Obr. 4a a 4b ukazují křivky dávka-odpověď pro p53 (A/C/N/53) pro tumory MDA-MB-231 (-231) (obr. 4a) a pro tumory MDA-MB-468 (obr. 4b). Myším byla podána dávka 1×10^7 - 1×10^9 C.I.U. p53 Ad (A/C/N/53) rozdělená do 10 dávek podaných peritumorálně v dny 0-4 a 7-10. Průměrné procento inhibice bylo vypočítáno srovnáním objemů tumoru pro každou dávku p53 Ad s nádory ošetřenými puftrem v dny 14/15, 18, 21, 24, 28, 30/32 a 35

(nádory MDA-MB-468 pouze v den 35). Průměrný objem -231 nádorů byl v den 0 přibližně $22,5 \pm 1,2 \text{ mm}^3$, zatímco průměrný objem -468 nádorů byl v den 0 přibližně $33,1 \pm 1,8 \text{ mm}^3$.

Obr. 5 ukazuje srovnání účinnosti terapeutického činidla podaného v jedné bolusové dávce a v dělených dávkách. Do nádorů byla podána celková dávka $2,2 \times 10^8$ C.I.U. p53 Ad za týden během týdnu 1 a 3.

Obr. 6 ukazuje účinnost více cyklů nízké dávky p53 Ad na velké, dobře uchycené nádory. Do xenotransplantátů MDA-MB-468 byla podána celková dávka $1,32 \times 10^9$ C.I.U. p53 Ad během 6 týdnů. (P = plató v kontrole růstu nádorů; E = konec aplikace).

Obr. 7a, 7b a 7c ukazují in vivo inhibici MDA-MB-468 nádorů u holých myší po dávkách $1,10^9$ C.I.U. p53 Ad (A/C/N/53) v jedné bolusové dávce (7a), ve třech injekcích (7b) nebo v 5 injekcích (7c).

Obr. 8 ukazuje schopnost nízkých dávek dexamethasonu potlačovat inhibici nádorového růstu zprostředkovanou NK buňkami u SCID myší. Do MDA-MB-231 nádorů byla podána celková dávka 2×10^9 A/C/N/53 β -gal Ad ($1,1 \times 10^{11}$ virových částic) v 10 injekcích podaných v den 14 - 18 a 21 - 25. Subkutánní pelety obsahující dexamethason (nebo placebo) uvolňovaly $83,3 \mu\text{g}$ steroidu za den.

Obr. 9 ukazuje srovnání kombinace terapie p53 a cisplatinou na normálních a na nádorových buňkách.

Předkládaný vynález obsahuje nové způsoby pro inhibici růstu a/nebo proliferace buněk, přesně růstu a proliferace nádorových buněk. V jednom provedení způsoby obsahují kontaktování buněk s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou nebo tumor-supresorovým proteinem a s adjuvantním protinádorovým činidlem. Obvykle bude tumor-supresorový protein nebo nukleová kyselina stejného druhu, jako je chybějící tumor-supresorový protein. Tak, pokud buňkách chybí endogenní aktivita p53, bude použit p53 protein nebo nukleová kyselina pro p53.

Překvapivým objevem předkládaného vynálezu je zjištění, které je v protikladu ke dřívějším studiím (viz například Wahl et al., (1996) Nature Med. 2(1): 72-79 a Hawkins et al., (1996) Cancer Res. 56: 892-898), že terapie savčích buněk, kterým chybí nebo které mají deficit endogenního přirozeného tumor-supresorového proteinu (t.j. mnoha neoplastických buněk) kombinací adjuvantního protinádorového činidla (například paclitaxelu (Taxol^R)) a tumor-supresorového genu nebo polypeptidu (například p53), vede k inhibici proliferace a/nebo růstu buněk, která je vyšší, než je inhibice pozorovaná při použití chemické léčby nebo léčby tumor-supresorovým konstruktem samotným. Kromě toho bylo zjištěno, že předléčení adjuvantním protinádorovým činidlem vede k výraznému zvýšení antiproliferačního účinku tumor-supresorové nukleové kyseliny. Bez vazby na konkrétní teorii se soudí, že mechanismus tohoto účinku adjuvantního protinádorového činidla je: zvýšení transfekční účinnosti různých vektorů pro genovou terapii (například adenovirových vektorů); nebo zvýšení exprese tumor-supresorového genu; nebo stabilizace mikrotubulů usnadňující intracelulární přenos viru; nebo zvýšená účinnost způsobená interakcemi různých intracelulárních mechanismů (například signálních drah, apoptotické dráhy, drah řídících buněčný cyklus).

V jednom provedení obsahuje předkládaný vynález způsob pro inhibici chorobně změněných savčích buněk postrádajících nebo deficitních ~~na~~ endogenní přirozený tumor-supresorový protein, kde uvedený způsob obsahuje kontaktování buněk s adjuvančním protinádorovým činidlem a s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou a/nebo tumor-supresorovým polypeptidem. Pokud jsou buňky přítomny v nádoru, tak způsob inhibuje růst nádoru a tak se jedná o způsob pro léčbu nádorů. Zejmána výhodnými tumor-supresorovými nukleovými kyselinami nebo polypeptidy jsou p53, RB, h-NUC (viz například Chen (1995) Cell Growth Differ. 6: 199-210) nebo jejich aktivní fragmenty (například p110RB, p56RB) a zejména výhodnými pomocnými protinádorovými činidly (sloučeninami) jsou paclitaxel a sloučeniny s aktivitou podobnou paclitaxelu, jako jsou deriváty paclitaxelu (například analogy paclitaxelu).

Objevem předkládaného vynálezu také je, že kontaktování buněk s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou a/nebo polypeptidem může inhibovat metastatické buňky. Taková inhibice může mít formu inhibice tvorby, růstu, migrace nebo reprodukce metastatických buněk. V jednom provedení může být inhibice charakterizována inhibicí (například redukcí a/nebo eliminací) vzniku nádorů oddělujících se od primárního tumoru. Tak vynález obsahuje způsob pro léčbu (zmírnění nebo eliminaci) metastatického onemocnění. Způsob obsahuje kontaktování metastatických buněk s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou a/nebo tumor-supresorovým polypeptidem. V zejména výhodném provedení obsahuje tento způsob kontaktování buněk v místě chirurgického zásahu (například po odstranění (debulkingu) nádorové hmoty) s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou a/nebo tumor-supresorovým polypeptidem v kombinaci s adjuvančním

protinádorovým činidlem. Buňky mohou být dále kontaktovány s adjuvantním protinádorovým činidlem, jak je zde popsáno.

V ještě dalším provedení obsahuje vynález výhodné léčebné režimy využívající tumor-supresorové geny a genové produkty. Částečně jsou tyto režimy založeny na překvapivém objevu, že tumor-supresorové nukleové kyseliny a/nebo polypeptidy jsou účinnější v inhibici buněčného nebo nádorového růstu, když jsou podány ve více dávkách oproti podání v jedné bolusové dávce.

Pořadí podání tumor-supresorového a protinádorového činidla není zásadní. Proto mohou být prostředky podány simultáně nebo sekvenčně. Například, v jednom provedení zvyšuje předléčení alespoň jedním adjuvantním protinádorovým činidlem (samostatným nebo v kombinaci s cytostatickým činidlem) účinnost následně podané tumor-supresorové nukleové kyseliny a/nebo polypeptidu. V jednom provedení je cytostatické činidlo podáno před adjuvantním protinádorovým činidlem a tumor-supresorovou nukleovou kyselinou a/nebo polypeptidem. V jiném provedení je adjuvantní protinádorové činidlo (samostatně nebo v kombinaci s cytostatickým činidlem) podáno simultáně s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou a/nebo polypeptidem. V ještě jiném provedení je tumor-supresorová nukleová kyselina a/nebo polypeptid podána před podáním adjuvantního protinádorového činidla.

Protinádorový účinek podaných prostředků a způsobů podle předkládaného vynálezu také zahrnuje protinádorový, nespecifický účinek, takzvaný "vedlejší účinek", (viz například Zhang (1996) Cancer Metastasis Rev. 15: 385-401 a Okada (1996) Gene Ther. 3: 957-96). Kromě toho, imunitní systém může být také ovlivňován tak, aby byly zvýrazněny humorální nebo buněčný systém imunity, t.j. může být ovlivňována odpověď B buněk

a/nebo T buněk (například cytotoxických lymfocytů (CTL) nebo lymfocytů infiltrujících nádor (TIL)). Zvýšení TIL je například pozorováno po podání adenoviru exprimujícího p53 lidem.

Přesněji, zvýšení TIL (fenotypicky T_H buněk, CD3+ a CD4+) je pozorováno po podání adenoviru exprimujícího p53 do arteria hepatica při léčbě metastas karcinomu do jater, jak je podrobněji popsána dále.

Je jasné, že způsoby podle předkládaného vynálezu nejsou omezeny na použití jednoho adjuvantního protinádorového činidla, ani na použití jednoho cytostatika. Tak vynález obsahuje způsoby pro inhibici chorobně změněných savčích buněk postrádajících endogenní přirozený tumor-supresorový protein, nebo inhibici nádoru obsahujícího takové buňky, kde uvedený způsob obsahuje kontaktování buněk nebo nádoru s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou a jedním nebo více pomocnými protinádorovými činidly, jak jsou zde popsána.

I. Pomocná protinádorová činidla

A. Činidla ovlivňující mikrotubuly

Jak bylo uvedeno výše, v jednom provedení vynález obsahuje způsoby pro inhibici chorobně změněných savčích buněk postrádajících endogenní přirozený tumor-supresorový protein, kde uvedený způsob obsahuje kontaktování buněk nebo nádoru s tumor-supresorovým proteinem nebo tumor-supresorovou nukleovou kyselinou a adjuvantním protinádorovým činidlem, jako je činidlo ovlivňující mikrotubuly (například paclitaxel, derivát paclitaxelu nebo sloučenina podobná paclitaxelu). Ve předkládaném vynálezu je činidlo ovlivňující mikrotubuly sloučenina, která interferuje s mitosou, t.j. sloučenina mající antimitotický účinek, tím, že ovlivňuje tvorbu a/nebo účinek

mikrotubulů. Takovými činidly jsou například činidla stabilizující mikrotubuly nebo činidla, která narušují tvorbu mikrotubulů.

Činidla ovlivňující mikrotubuly použitelná v předkládaném vynálezu jsou v oboru dobře známá a patří sem, bez omezení, allokolchicin (NSC 406042), Halichondrin B (NSC 609395), kolchicin (NSC 757), deriváty kolchicinu (například NSC 33410), dolastatin 10 (NSC 3761128), maytansin (NSC 153858), rhizoxin (NSC 332598), paclitaxel (Taxol^R, NSC 125973) deriváty Taxolu^R (například NSC 608832), thiokolchicin (NSC 361792), tritylcystein (NSC 83265), vinblastin sulfat (NSC 49842), vinkristin sulfat (NSC 67574), epothilon A, epothilon a discodermolid (viz Service, (1996) Science 274: 2009), estramustin, nocodazol, MAP4, a podobně. Příklady takových činidel jsou popsány v odborné a patentové literatuře, viz například Bulinsky (1997) J. Cell Sci. 110: 3055-3064; Panda (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 10560-10564; Muhlradt (1997) Cancer Res. 57: 3344-3346; Nicolau (1997) Nature 387: 286-272; Vasquez (1997) Mol. Biol. Cell. 8: 973-985; Panda (1996) J. Biol. Chem. 271: 29807-29812.

Zejména výhodnými činidly jsou sloučeniny s aktivitou podobnou paclitaxelu. Sem patří, bez omezení, paclitaxel a deriváty paclitaxel (sloučeniny podobné paclitaxelu) a analogy paclitaxelu. Paclitaxel a jeho deriváty jsou komerčně dostupné. Kromě toho, způsoby výroby paclitaxelu a derivátů paclitaxelu a analogů paclitaxelu jsou odborníkům v oboru dobře známe (viz například U.S. patenty č. 5569729; 5565478; 5530020; 5527924; 5508447; 5489589; 5488116; 5484809; 5478854; 5478736; 5475120; 5486769; 5461169; 5440057; 5422364; 5411984; 5405972; a 5296506.

Další činidla ovlivňující mikrotubuly mohou být hodnocena pomocí jednoho z testů, které jsou známé v oboru, například pomocí semiautomatizovaného testu, který měří tubulin-polymerizační aktivitu analogů paclitaxelu v buněčném testu pro stanovení potenciálu těchto sloučenin pro blokování buněk v mitose (viz Lopes (1997) *Cancer Chemotherap. Pharmacol.* 41: 37-47).

Obecně je aktivita testované sloučeniny určena kontaktováním buňky se sloučeninou a určením toho, zda je či není narušen buněčný cyklus, zejména z důvodů inhibice mitosy. Taková inhibice může být způsobena narušením mitotického aparátu, například narušením normální tvorby vřeténka. Buňky s poruchou mitosy mohou být charakterizovány změněnou morfologií (například skladbou mikrotubulů, zvýšeným počtem chromosomů atd.).

Ve výhodném provedení jsou sloučeninou s možnou polymerizační aktivitou na tubulin vyhledávány *in vitro*. Ve výhodném provedení jsou sloučeniny vyhledávány na kultivovaných WR21 buňkách (odvozených z linie 69-2 wap-ras myší), kdy je stanovována inhibice proliferace a/nebo změněná buněčná morfologie, zejména skladba mikrotubulů. *In vivo* skríníng pozitivních sloučenin může být potom proveden za použití holých myší nesoucích WR21 nádorové buňky. Podrobný protokol pro tuto skríníngovou metodu je popsán v Porter (1995) *Lab. Anim. Sci.* 45(2): 145-150.

Další metody pro vyšetřování sloučenin na požadovanou aktivitu jsou v oboru dobře známé. Typicky takové testy obsahují testy na inhibici tvorby a/nebo rozkladu mikrotubulů. Testy na tvorbu mikrotubulů jsou popsány například v Gaskin et al. (1974) *J. Molec. Biol.* 89: 737-758. U.S. patent č. 5569720

také obsahuje in vitro a in vivo testy na vyhledávání sloučenin s aktivitou podobnou paclitaxelu.

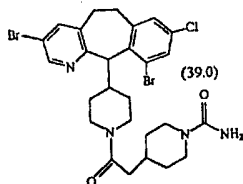
B. Inhibitory polyprenyl-protein transferasy

V ještě jiném provedení obsahuje předkládaný vynález kombinované použití tumor-supresorových nukleových kyselin a/nebo polypeptidů a inhibitorů polyprenyl-protein transferasy. Mezi zejména výhodné inhibitory polyprenyl-protein transferasy patří, bez omezení, inhibitory farnesyl-protein transferasy (FPT), inhibitory geranylgeranyl-protein transferasy a jiných monoterpen-protein transferas. Příklady sloučenin, které jsou inhibitory polyprenyl-protein transferasy, jsou dobře známé v odborné a patentové literatuře, viz například Zhang (1997) J. Biol. Chem. 272: 10232-10239; Njoroge (1997) J. Med. Chem. 40: 4290-4301; Mallams (1997) Bioorg. Med. Chem. 5: 93-99.

Příklady inhibitorů farnesyl-protein transferasy jsou uvedeny dále:

FPT inhibitor, označený "FPT39", je popsán v mezinárodní přihlášce WO 97/23478, podané 19.12.1996, ve které je jako FPT39 označena sloučenina "39.0", viz strana 95 WO 97/23478.

Sloučenina FPT39:



Oligopeptidy (většinou tetrapeptidy, ale také pentapeptidy mající vzorec Cas-Xaa1-Xaa2-Xaa3; EPA 461489; EPA 520823; EPA 528486 a WO 95/11917).

Peptidomimetické sloučeniny, zejména Cys-Xaa-Xaa-Xaa mimetika: EPA 535730; EPA 535731; EPA 618221; WO 94/09766; WO 94/10138; WO 94/07966; US 5326733; US 5340828; US 5420245; WO 95/20396; US 5439918 a WO 95/20396.

Farnesylované peptidomimetické sloučeniny - zejména farnesylované Cas-Xaa-Xaa-Xaa mimetikum: GB-A2276618.

Jiné peptidomimetické sloučeniny: US 5352705; WO 94/00419; WO 95/00497; WO 95/09000; WO 95/09001; WO 91/12612; WO 95/25086; EPA 675112 a FR-A 2718149.

Kondenzované tricyklické benzocykloheptapyridiny: WO 95/10514; WO 95/10515; WO 95/10516; WO 96/30363; WO 96/30018; WO 96/30017; WO 96/30362; WO 96/31111; WO 96/31478; WO 96/31477; WO 96/31505; Mezinárodní patentová přihláška č. PCT/US96/19603 WO 97/23478; U.S. přihláška pořadové č. 08/728104; U.S. přihláška pořadové č. 08/712989; U.S. přihláška pořadové č. 08/713326; U.S. přihláška pořadové č. 08/713908; U.S. přihláška pořadové č. 08/713705; U.S. přihláška pořadové č. 08/713703; U.S. přihláška pořadové č. 08/710225; U.S. přihláška pořadové č. 08/711925; U.S. přihláška pořadové č. 08/712924; U.S. přihláška pořadové č. 08/713323 a U.S. přihláška pořadové č. 08/713297.

Deriváty farnesylu: EPA 534546; WO 94/19357; WO 95/08546; EPA 537007 a WO 95/13059.

Přirozené produkty a deriváty: WO 94/18157; U.S. 5430055; GB-A 2261373; GB-A 2261374; GB-A 2261375; U.S. 5420334; U.S. 5436263.

Jiné sloučeniny: WO 94/26723; WO 95/08542; US 5420157; WO 95/21815 a WO 96/31501.

C. Sloučeniny s antiangiogenní aktivitou

Tumor-supresorové proteiny a nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu mohou být podány také společně se sloučeninami s antiangiogenní aktivitou. Výhodné sloučeniny s antiangiogenní aktivitou inhibují tvorbu nebo proliferaci cév, lépe tvorbu a/nebo proliferaci cév v nádoru.

Mezi vhodné sloučeniny s antiangiogenní aktivitou patří - bez omezení - galardin (GM6001, Glycomed, Inc., Alameda, CA), inhibitory odpovědi endotelu (například interferon α , TNP-470 a inhibitory vaskulárního endotelového růstového faktoru), činidla, která napomáhají rozrušení buněčné matrix (například Vitaxin (lidská LM-609 protilátka, Ixsys Co., San Diego, CA; Metastat, CollaGenex, Newtown, PA; a Marimastat BB2516, British Biotech), a činidla, která působí přímo na růst cév (například CM-101, který je odvozen od exotoxinu antigenu streptokoku skupiny A a který se váže na nové krevní cévy a způsobuje intenzivní zánětlivou odpověď u hostitele, a Thalidomid).

Také bylo zjištěno, že několik druhů steroidů vykazuje antiangiogenní aktivitu. Konkrétně, několik studií uvedlo, že medroxyprogesteronacetat (MPA, syntetický progesteron, výrazně inhibuje neovaskularizaci v testu na králičí rohovce (Oikawa (1988) Cancer Lett. 43: 85). Proléčivo 5-FU, 5'-deoxy-5-fluoruridin (5'FUDR), může být také charakterizováno jako antiangiogenní sloučenina, protože 5'DFUR je konvertován na 5FU

thymidin-fosforylasovou aktivitou PD-ECGF/TP. 5'DFUR může být selektivně aktivní pro PD-ECGF/TP pozitivní nádorové buňky s vysokým angiogenním potenciálem. Poslední klinické studie ukázaly, že 5'DFUR je pravděpodobně účinný pro PD-ECGF/TP pozitivní nádory. Bylo prokázáno výrazné zvýšení protinádorového účinku 5'DFUR u PD-ECGF/TP transfektovaných buněk ve srovnání s netransfektovanými přirozenými buňkami (Haraguchi (1993) Cancer Res. 53: 5680-5682). Kromě toho, kombinované sloučeniny 5'DFUR a MPA vykazují také silný antiangiogenní účinek (Yayoi (1994) Int. J. Oncol. 5: 27-32). Kombinace 5'DFUR a MPA může být charakterizována jako kombinace dvou inhibitorů angiogeneze s různými spektry, t.j. kombinace inhibitoru endotelového růstového faktoru s inhibitorem proteasy. Kromě toho, v in vivo pokusech využívajících DMBA-indukovaný karcinom prsu u krys vykazoval 5'DFUR kombinovaný účinek s AGM-1470 (Yamamoto (1995) Oncol. Reports 2: 793-796).

Jinou skupinou sloučenin s antiangiogenní aktivitou, které jsou použitelné v předkládaném vynálezu, jsou polysacharidy, které mohou interferovat s funkcí růstových faktorů s vazbou na heparin, které navozují angiogenesi (například pentosan^{poly}sulfat).

Mezi další modulátory angiogeneze patří destičkový faktor IV a AGM 1470. Ještě další modulátory angiogeneze jsou získány z přirozených zdrojů a patří sem inhibitor kolagenasy, analogy vitaminu D3, fumigallin, herbimycin A a isoflavony.

D) Endokrinní terapie

Endokrinní terapie, která je známou a dobře zavedenou cytostatickou léčbou, může vést k přechodu hormonálně-dependentních buněk do klidové fáze a může redukovat počet nádorových buněk in vivo a může inhibovat růst nádorů u

pacientů s hormonálně-dependentními nádory. Očekává se, že taková terapie zvýší účinek tumor-supresorových činidel v léčbě hyperproliferativních buněk. Tak obsahuje vynález v dalším aspektu kombinované použití tumor-supresorové nukleové kyseliny a/nebo polypeptidu a antiestrogenu, antiandrogenu nebo antiprogestinu. Hormonální léčiva jsou v oboru dobře známá a patří sem, například, tamoxifen, toremifen (viz např. U.S. 4696949), flutamid, megace a lupron (viz též například WO 91/00732; WO 93/10741; WO 96/26201 a Gauthier et al., J. Med. Chem. 40: 2117-2122 (1997)).

E) Podání adjuvantních protinádorových činidel:
Farmaceutické prostředky

Farmaceutické prostředky

Pomocná protinádorová činidla použitá ve způsobech podle předkládaného vynálezu jsou obvykle kombinována s farmaceuticky přijatelným nosičem (přísadou) za vzniku farmaceutického prostředku. Farmaceutické prostředky podle předkládaného vynálezu mohou obsahovat jedno nebo více adjuvantních protinádorových činidel s nebo bez tumor-supresorového genu nebo polypeptidu, například p53 nebo RB.

Farmaceuticky přijatelné nosiče mohou obsahovat fyziologicky přijatelnou sloučeninu, která například stabilizuje prostředek nebo zvyšuje nebo snižuje absorpci činidla a/nebo farmaceutického prostředku. Mezi fyziologicky přijatelné sloučeniny patří, například, uhlovodany, jako je glukosa, sacharosa nebo dextrany, antioxidační činidla, jako je kyselina askorbová nebo glutathion, chelační činidla, proteiny s nízkou molekulovou hmotností, prostředky, které redukuje klírens nebo hydrolýzu adjuvantních protinádorových činidel, nebo přísady

nebo jiná stabilizační činidla a/nebo pufrý. Detergenční činidla mohou být také použita pro stabilizaci prostředků nebo pro zvýšení nebo snížení absorpce farmaceutického prostředku (příklady detergenčních činidel viz dále).

Mezi další fyziologicky přijatelné sloučeniny patří smáčivá činidla, emulgační činidla, dispergační činidla nebo konzervační činidla, která jsou zejména vhodná pro prevenci růstu nebo působení mikroorganismů. Různá konzervační činidla jsou dobře známá a patří mezi ně například fenol nebo kyselina askorbová. Odborníkům v oboru bude jasné, že volba farmaceuticky přijatelného nosiče, včetně fyziologicky přijatelné sloučeniny, závisí, například, na způsobu podání adjuvantního protinádorového činidla a na fyzikálně chemických vlastnostech adjuvantního protinádorového činidla.

Prostředky pro podání budou obvykle obsahovat roztok adjuvantního protinádorového činidla ve farmaceuticky přijatelném nosiči, výhodně ve vodném nosiči pro adjuvantní protinádorové činidlo rozpustné ve vodě. Mohou být použity různé nosiče, například pufrovaný salinický roztok a podobně. Tyto roztoky jsou sterilní a prosté nežádoucího materiálu. Tyto prostředky mohou být sterilizovány běžnými, dobře známými technikami sterilizace. Prostředky mohou obsahovat farmaceuticky přijatelné pomocné složky, které jsou nutné pro přiblížení prostředku fyziologickým podmínkám, jako jsou činidla pro úpravu pH a pufrovací činidla, činidla upravující tonicitu a podobně, jako je například octan sodný, chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid vápenatý, laktat sodný a podobně. Koncentrace adjuvantního protinádorového činidla v těchto prostředcích se může velmi lišit a může být vybrána primárně podle objemu kapaliny, podle viskozity, tělesné

hmotnosti a podobně, podle vybraného způsobu podání a potřeb pacienta.

Způsoby podání

Pomocná protinádorová činidla použitá ve způsobech podle předkládaného vynálezu mohou být podána samostatně nebo ve farmaceutických prostředcích (s nebo bez tumor-supresorového činidla, například p53) jakýmkoliv v oboru známým způsobem, například systémově, regionálně nebo lokálně; intraarteriálně, intratumorálně, intravenosně (IV), parenterálně, do pleurální dutiny, lokálně, orálně, nebo lokálně, například subkutánně, intratracheálně (například ve formě aerosolu) nebo transmukosálně (například bukálně, intravesikálně, vaginálně, do děložní dutiny, rektálně, nasálně), intratumorálně (například transdermálně nebo lokální injekcí). Zejména výhodným způsobem podání je podání intraarteriální, zejména tehdy, pokud je žádoucí "regionální účinek", například zaměřený na specifický orgán (například mozek, játra, slezinu, plíce). Například, injekce do a. hepatica je výhodná, pokud je žádoucí regionální protinádorový účinek v játrech; nebo, injekce do a. carotis je výhodná, pokud je žádoucí podání prostředku do mozku (například pro léčbu mozkových nádorů), karotidy, nebo arterie patřící ke karotickému systému (například a. occipitalis, a. auricularis, a. temporalis, mozkové arterie, a. maxilaris, atd.).

Paclitaxel a deriváty paclitaxelu jsou pouze částečně rozpustné ve vodných roztocích. Ve výhodném provedení jsou tyto prostředky podány přímo do nádoru lokálně (například injekcí, kanalizací, nebo přímou aplikací během chirurgického zákroku), nebo jsou solubilizovány v přijatelném činidle. Způsoby pro podání paclitaxelu a derivátů paclitaxelu jsou v oboru dobře

známé (viz například U.S. patenty č. 5583153; 5565478; 5496804; 45484809). Jiné deriváty paclitaxelu jsou ve vodě rozpustné analogy a/nebo proléčiva (viz U.S. patent č. 5411984 a 5422364) a výhodně mohou být podány jakoukoliv technikou popsanou výše.

Farmaceutické prostředky podle předkládaného vynálezu jsou zejména vhodné pro lokální podání, například pro podání do chirurgických ran pro prevenci počínajících nádorů, neoplastických a metastatických buněk a jejich prekursorů. V jiném provedení jsou prostředky vhodné pro parenterální podání, jako je intravenózní podání nebo podání do tělesných dutin nebo do lumen orgánu.

Léčebné režimy

Farmaceutické prostředky mohou být podány v různých dávkových jednotkách, v závislosti na způsobu podání. Například, mezi jednotkové dávkové formy vhodné pro orální podání patří prášek, tablety, pilulky, kapsle a lékařské oplatky. Je známo, že adjuvantní protinádorové sloučeniny (například paclitaxel a podobné sloučeniny) musí být při orálním podání chráněny před trávením. Toto chránění je obvykle provedeno vytvořením komplexu adjuvantního protinádorového činidla s prostředkem, který je činí resistantním na kyselou nebo enzymatickou hydrolýzu, nebo obalením adjuvantního protinádorového činidla vhodným resistantním nosičem, jako jsou například liposomy. Prostředky pro chránění sloučenin před trávením jsou v oboru dobře známy (viz například U.S. patent č. 5391377, který popisuje liposomové prostředky pro orální podání terapeutických činidel).

Dávky obvyklých chemoterapeutických činidel jsou v oboru dobře známy. Kromě toho, tyto dávky jsou obvykle doporučeny

29.10.99

dávkami a mohou být upraveny podle terapeutických souvislostí, tolerance pacienta atd.. Tak je například obvyklá dávka farmaceutického prostředku (například paclitaxelu) pro intravenosní podání (IV) přibližně 135 mg/m^2 během 1 - 24 hodin (obvykle během 1, 3 nebo 6 hodin, nejlépe během 3 hodin) a tato dávka je nejlépe opakována každé tři týdny, celkem ve 3 až 6 cyklech. Pro snížení frekvence a závažnosti hypersensitivních reakcí může být pacientům také podáno přibližně 20 mg dexamethasonu (Decadron nebo jiné výrobky) orálně přibližně 12 a 6 hodin před aplikací paclitaxelu a přibližně 50 mg diphenhydraminu (Benadryl^R nebo jiné) plus přibližně 300 mg cimetidinu (Tagamet^R) nebo 50 mg ranitidinu (Zantac^R) IV 30 až 60 minut před aplikací paclitaxelu. Mohou být podány výrazně vyšší dávky (například až do 350 mg/m^2 na den), zejména pokud se jedná o aplikaci do ohraničeného regionu a ne do krevního řečiště, jak je tomu při aplikaci do tělesných dutin nebo do lumen orgánu. Podání významně vyšších dávek je také možné jakýmkoliv vybraným způsobem, například lokálním podáním. Způsoby pro přípravu prostředků pro parenterální podání jsou v oboru dobře známé a jsou podrobněji popsány v publikacích jako je Remington's Pharmaceutical Science, 15. vydání, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) a v U.S. patentech č. 5583153; 5565478; 5496804 a 5484809. Obvyklé dávky pro intraperitoneální podání budou přibližně $20\text{-}150 \text{ mg/m}^2$ jednou týdně nebo přibližně 250 mg/m^2 jednou za 3 týdny.

Prostředky obsahující pomocná protinádorová činidla mohou být podány pro terapeutickou léčbu. V terapeutických aplikacích jsou prostředky podány pacientům s onemocněním charakterizovaným hyperproliferací jednoho nebo více typů buněk v takovém množství, které je dostatečné pro vyléčení nebo alespoň částečné zastavení onemocnění a/jeho komplikací. Takové množství je definováno jako "terapeuticky účinná dávka". Účinné

množství pro takové použití bude záviset na závažnosti onemocnění a celkovém zdravotním stavu pacienta.

Může být použito jednorázové nebo opakované podání prostředků, podle požadované dávky a frekvenci a tolerance pacienta. Při jakémkoliv způsobu podání by měl prostředek dodat dostatečné množství adjuvantních protinádorových činidel pro účinnou léčbu pacienta.

II. Tumor-supresorové geny a genové produkty

A) Výhodné známé tumor-supresorové geny

Jak bylo uvedeno výše, obsahuje v jednom provedení vynález způsoby pro inhibici růstu a/nebo proliferace buněk, které obsahují kontaktování buněk s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou a s adjuvantním protinádorovým činidlem (například paclitaxelem, derivátem paclitaxelu nebo sloučeninou podobnou paclitaxelu).

Tumor-supresorové geny jsou v oboru dobře známé a patří mezi ně, například, RB, p53, APC, FHIT (viz např. Siprashvili (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13771-13776), BRCA1 a BRCA2, VHL, WT, DCC, FAP, NF, MEN, E-kadherin, nm23, MMAC1 a PTC. RB neboli retinoblastomový gen je prototypem tumor-supresorového genu a byl dobře prozkoumán (viz například Bookstein (1990) Science 247: 712-715; Benedict (1980) Cancer Invest. 8: 535-540; Riley (1990) Ann. Rev. Cell Biol. 10: 1-29; a Wienberg (1992) Science 254: 1138-1146. Snad nejlépe charakterizovaným tumor-supresorovým genem je p53, jehož vliv se předpokládá u mnoha neoplastických onemocnění, stejně jako u genetických předpokladů pro vznik různých nádorů v rodinách s Li-Fraumeni syndromem (viz například Wills (1994, Hum. Gene Therap. 5:

29.10.99

1079-1088; U.S. patent č. 5532220; WO 95/289048 a Harris (1996) J. Nat. Canc. Inst. 88(20): 1442), kde tyto odkazy popisují klonování, expresi a použití p53 v genové terapii). Mezi další tumor-supresorové geny patří WT (t.j. WT1 v pozici 11p13) gen, který je charakteristický pro Wilmsův tumor (viz Call et al., (1990), Cell 60:509-520; Gessler (1990), Nature 343: 774-778; a Rose et al., (1990), Cell 60: 495-508). Tumor-supresorový gen FHIT, pro Fragile Histidin Triad, byl zjištěn v regionu chromosomu 3 (3p14.2, též popsáný v 3p21), o které je známo, že je častým místem translokací, zlomů a mezer a soudí se, že vede ke vzniku nádorů jícnu, žaludku a tlustého střeva (viz například Ohta et al. (1996) Cell 84: 587-597; GenBank přírůstkové č. U469227). Tumor-supresorové geny DCC (18q21) a FAP jsou asociovány s karcinomem tlustého střeva (viz například Hedrick et al. (1994) Genes Dev. 8(10): 1174-1183, ; GenBank přírůstkové č. X76132 pro DCC; a Wienberg (1992), Science 254: 1138-1146 pro FAP). NF tumor-supresorové geny (NF1 v pozici 17q11 a NF2 v pozici 22q12) jsou asociovány s neurologickými nádory (například s neurofibromatosou v případě NF1, viz například Caivthon et al. (1990) Cell 62: 193-201; Viskochil et al., (1990), Cell 62: 187-192; Wallace et al. (1990) Science 249: 181-186; a Xug et al. (1990) Cell 62: 599-608; a s meningeomy a schwanomy v případě NF2). MEN tumor-supresorový gen je asociován s nádory v rámci syndromu mnohotné endokrinní neoplasie (viz například Wienberg, Science 254: 1138-1146; a Marshall (1991) Cell 64: 313-326). VHL tumor-supresorový gen je asociován s von Hippel-Landquovou chorobou (Latif (1993) Science 260: 1317-1320, ; GenBank přírůstkové č. L15409). Rozsáhle studované geny BRCA1 a BRCA2 jsou asociovány s karcinomem prsu (viz například Skolnick (1994) Science 266: 66-71, ; GenBank přírůstkové č. U14680 pro BRCA1; a Teng (1996) Nature Genet. 13: 241-244, ; GenBank přírůstkové č. U43746)). Dále, E-kadherin^{gen} je asociován s invasivním fenotypem karcinomu

prostaty (Umbas (1992) Cancer Res. 52: 5104-5109; Bussemakers (1992) Cancer Res. 52: 2916-2999, ; GenBank přírůstkové č. 272397). NM23 gen je asociován s metastasami nádorů (Dooley (1994) Hum. Genet. 93(1): 63-66, ; GenBank přírůstkové č. X75598). K dalším tumor-supresorovým genům patří DPC4 (identifikovaný v 18q21) asociovaný s karcinomem slinivky břišní, hMLH1 (3p) a hMSH2 (2p) asociované s karcinomem tlustého střeva a CDKN2 (p16) a (9p) asociovaný s melanomem, karcinomy slinivky břišní a jícnu. Nakonec, lidský PTC gen (homolog drosophilla "patched" (ptc) genu) je asociován se syndromem nevoidního bazocelulárního karcinomu (NBCCS) a se somatickými bazocelulárními karcinomy (viz například Hahn et al. (1996) Cell 85: 841-851). Tento seznam tumor-supresorových genů není vyčerpávající ani limitující a je míněn pouze jako ilustrace velkého počtu známých tumor-supresorových genů.

B) Identifikace a skríníng dosud neznámých tumor-supresorových genů

Způsoby pro identifikace a nebo testování tumor-supresorových genů jsou v oboru dobře známé. Obvykle jsou hyperproliferativní buňky vyšetřovány na ztrátu nebo mutaci genu, která je spojena (koreluje) s hyperproliferativním stavem. Nejprísnějším testem pro gen, který má být kvalifikován jako tumor-supresorový gen (TSG), je jeho schopnost potlačovat tumorigenní fenotyp nádoru nebo nádorových buněk odvozených z nádoru. Tumor-supresorová nukleová kyselina je výhodně vložena do nádorových buněk jako klonovaná cDNA ve vhodném expresním vektoru nebo je jednotlivý chromosom nesoucí gen, který je kandidátem na tumor-supresorový gen, vložen do nádorových buněk technikou mikrobuněčného přenosu. Alternativně je produkt tumor-supresorového genu (například tumor-supresorový polypeptid) vložen do buněk a měří se proliferace buněk

(například stanovením počtu buněk nebo měřením objemu nádoru, atd.). Kompletní nebo částečná inhibice proliferace (např. snížení rychlosti proliferace), kontaktní inhibice, ztráta invazivního fenotypu, diferenciací buněk a apoptosa jsou indikátory suprese tumorigenního fenotypu (redukované schopnosti neoplastického růstu).

Způsoby pro skríníng nádorů pro identifikaci změněných nebo neexprimovaných nukleových kyselin jsou v oboru dobře známé. Takové metody zahrnují, bez omezení, subtraktivní hybridizaci (viz například Hampson (1992) *Nucleic Acids Res.* 20: 2899), komparativní genomovou hybridizaci ((CGH), viz například WO 93/18186; Kallioniemi (1992) *Science* 258: 818) a monitorování exprese za použití sestav nukleokyselinových sond s vysokou hustotou (viz například Lockhart (1996) *Nature Biotechnology* 14(13): 1675-1680).

C. Příprava p53 a jiných tumor-supresorových genů

Jak bylo uvedeno výše, vynález obsahuje kontaktování buněk, například in vitro, ve fyziologickém roztoku (například v krvi), ve tkáni orgánu, nebo v organismu, s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou nebo produktem tumor-supresorového genu, jako je například polypeptid. Tumor-supresorovou nukleovou kyselinou nebo polypeptidem může být nukleová kyselina nebo polypeptid jakéhokoliv známého tumor-supresorového genu, včetně - bez omezení - RB., p53, h-NUC (Chen (1995), výše), APC, FHIT, BRCA1, BRCA2, VHL, WT, DCC, FAP, NF, MEN, E-kadherinu, nm23, MMACI a PTC, jak jsou popsány výše. Ve výhodném provedení je tumor-supresorem RB nukleová kyselina nebo polypeptid nebo p53 nukleová kyselina nebo polypeptid nebo jejich aktivní fragment.

V nejvýhodnějším provedení je RB nebo p53 tumor-supresorová nukleová kyselina přítomna v expresní kazetě pod kontrolou promotoru, která exprivuje tumor-supresorový gen nebo cDNA při jejím umístění v cílových (například nádorových) buňkách. Způsoby pro konstrukci expresních kazet a/nebo vektorů kodujících tumor-supresorové geny jsou v oboru dobře známe a jsou popsány dále.

1. Příprava tumor-supresorové nukleové kyseliny

DNA kodující tumor-supresorové proteiny nebo subsekvence proteinů podle předkládaného vynálezu může být připravena jakoukoliv vhodnou technikou, včetně například klonování a restrikce vhodných sekvencí nebo přímou chemickou syntézou (například za použití známých informací o sekvenci, jak byly uvedeny výše), technikami jako je fosfotriesterová metoda (Narang, (1979), Meth. Enzymol. 68: 90-99), fosfodiesterová metoda (Brown et al., Meth. Enzymol. 68: 109-151 (1979), diethylfosforamiditová metoda (Becauge et al. (1981), Tetrahedr. Lett. 22: 1859-1862), a metoda syntézy na pevném nosiči (U.S. patent č. 4458066).

Při chemické syntéze se získá jednořetězcový oligonukleotid. Tento oligonukleotid může být přeměněn na dvojřetězcovou DNA hybridizací s komplementární sekvencí, nebo polymerizací s DNA polymerasou za použití jediného řetězce jako templatu. Odborníkům v oboru bude známo, že chemická syntéza DNA je omezena na sekvence přibližně 100 bazí, delší sekvence mohou být získány ligací kratších sekvencí.

Alternativně mohou být subsekvence klonovány a vhodné subsekvence mohou být štěpeny za použití vhodných restrikčních

enzymů. Fragmenty mohou být potom ligovány za vzniku požadované DNA sekvence.

V jednom provedení může být tumor-supresorová nukleová kyselina podle předkládaného vynálezu klonována za použití techniky pro amplifikaci DNA, jako je polymerasová řetězová reakce (PCR). Tak je například sekvence nebo subsekvence nukleové kyseliny amplifikována PCR, za použití kodujícího primeru obsahujícího jedno restrikční místo (například NdeI) a protismyslného primeru obsahujícího jiné restrikční místo (například HindIII). Takto se získá nukleová kyselina kodující požadovanou tumor-supresorovou sekvenci nebo subsekvenci, která má koncová restrikční místa. Nukleová kyselina může být potom snadno ligována do vektoru obsahujícího nukleovou kyselinu kodující druhou molekulu, který má vhodná odpovídající restrikční místa. Vhodné PCR primery mohou být vybrány odborníkem v oboru za použití publikovaných sekvencí pro jakýkoliv známý tumor-supresorový gen, cDNA nebo protein. Vhodná restrikční místa mohou být také přidána k nukleové kyselině kodující tumor-supresorový protein nebo subsekvence proteinu místně cílenou mutagenesí. Plasmid obsahující tumor-supresorovou sekvenci nebo subsekvenci je štěpen vhodnými restrikčními endonukleasami a potom je ligován do vektoru kodujícího druhou molekulu za použití běžných technik.

Jak je uvedeno výše, sekvence nukleových kyselin pro mnoho tumor-supresorových genů jsou známy. Tak například, sekvence nukleové kyseliny pro p53 je uvedena v Lamb et al. (1986) Mol. Cell Biol. 6: 1379-1385, GenBank přírůstkové č. M13111). Obdobně, sekvence nukleové kyseliny pro RB je uvedena v Lee et al. (1987) Nature 329: 642-645 (GenBank přírůstkové č. M28419). Sekvence nukleových kyselin pro další tumor-supresorové geny jsou dostupné, jak je uvedeno výše v části II(a). Za použití

dostupných informací o sekvencích může odborník v oboru klonovat tumor-supresorové geny do vektorů vhodných pro provedení předkládaného vynálezu.

p53 a RB tumor-supresorové geny jsou zejména vhodné pro použití ve způsobech podle předkládaného vynálezu. Způsoby pro klonování p53 a RB d vektorů vhodných pro expresi příslušných tumor-supresorových proteinů nebo pro použití v genové terapii jsou v oboru dobře známé. Například, klonování a použití p53 je podrobně popsáno v Wills (1994), výše; v U.S. patentu č. 5532220; v USSN 08/328673, podané 25.10.1994 a ve WO 95/11984. Obvykle je konstruována expresní kazeta s tumor-supresorovou cDNA v operabilní vazbě na promotor, nejlépe na silný promotor (například Ad2 hlavní pozdní promotor (Ad2 MLP), nebo na lidský cytomegalovirový bezprostřední časný genový promotor (CMV)). V zejména výhodném provedení po promotoru následuje trojitá vedoucí cDNA a po tumor-supresorové cDNA následuje polyadenylační místo (například Elb polyadenylační místo) (viz například USSN 08/328673, WO 95/11984 a Wills (1994), výše). Mělo by být jasné, že vhodné jsou také různé tkáňově specifické promotory. Například, promotor tyrosinasy může být použit pro cílení exprese na melanomy (viz například Siders (1996) Cancer Res. 56: 5638-5646). V zejména výhodném provedení je tumor-supresorová cDNA exprimována ve vektoru vhodném pro genovou terapii, jak je popsáno dále.

2. Příprava tumor-supresorového proteinu

a) Chemická syntéza de novo

Za využití známých sekvencí mohou být syntetizovány tumor-supresorové polypeptidy, tumor-supresorové proteiny nebo jejich subsekvence, za použití standardních technik peptidové syntézy.

Pokud jsou požadované subsekvence relativně krátké (například pokud je požadována určitá antigenní determinanta), může být molekula syntetizována jako jediný souvislý polypeptid. Pokud je požadována větší molekula, tak mohou být subsekvence syntetizovány zvlášť (v jedné nebo ve více jednotkách) a potom mohou být fúzovány kondenzací amino-konce jedné molekuly na karboxy-konec druhé molekuly, za vzniku peptidové vazby.

Syntéza na pevné fázi, ve které je C-koncová aminokyselina sekvence připojena na nerozpustný nosič a potom následuje adice zbývajících aminokyselin sekvence, je výhodnou technikou pro syntézu polypeptidů podle předkládaného vynálezu. Techniky pro syntézu na pevné fázi jsou popsány v Barany and Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis, str. 3-284 v The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part a; Merrifield et al., J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2156 (1963); a v Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2. vydání, Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984).

b) Rekombinantní exprese

Ve výhodném provedení jsou tumor-supresorové proteiny nebo jejich subsekvence syntetizovány technikou rekombinantní DNA. Obecně tato technika vyžaduje vytvoření DNA sekvence, která koduje fúzní protein, umístění DNA do expresní kazety pod kontrolou určitého promotoru, exprese proteinu v hostiteli, izolaci exprimovaného proteinu a pokud je to žádoucí, tak renaturaci proteinu.

Způsoby pro klonování tumor-supresorových nukleových kyselin do určitých vektorů jsou popsány výše. Sekvence nukleové kyseliny kodující tumor-supresorový protein nebo subsekvence proteinu mohou být potom exprimovány v celé řadě hostitelů,

včetně *E. coli*, jiných bakteriálních hostitelů, kvasinek a různých vyšších eukaryotických buněk jako jsou COS, CHO a HeLa buněčné linie a myelomové buněčné linie. Protože se tumor-supresorové proteiny obvykle vyskytují v eukaryotických buňkách, jsou přednostně použity eukaryotické hostitelské buňky. Gen pro rekombinantní protein je operativně navázán na vhodné sekvence kontrolující expresi pro každého hostitele. Pro *E. coli* to znamená vazbu na promotor, jako je T7, trp nebo lambda promotor, vazebné místo pro ribosomy a transkripční terminační signál. Pro eukaryotické buňky kontrolní sekvence zahrnují promotor a výhodně zesilovač transkripce odvozený od genů pro imunoglobuliny, SV40, cytomegaloviru atd., a polyadenylační sekvenci, a mohou sem také patřit sestřižené donorové a akceptorové sekvence.

Plasmidy podle předkládaného vynálezu mohou být přeneseny do vybrané hostitelské buňky za použití dobře známých technik, jako transformace *E. coli* za použití chloridu vápenatého a zpracování fosforečnanem vápenatým nebo elektroporace pro savčí buňky. Buňky transformované plasmidy mohou být selektovány podle resistance na antibiotika, která je způsobena geny obsaženými v plasmidech, jako jsou amp, gpt, neo a hyg geny.

Po expresi může být rekombinantní tumor-supresorový protein přečištěn za použití standardních technik, jako jsou srážení síranem amonným, afinitní kolony, chromatografie na koloně, gelová elektroforesa a podobně (viz, obecně, R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher, *Methods in Enzymology*, Vol. 182: *Guide to Protein Purification*., Academic Press, Inc., N.Y. (1990)). Výhodné jsou významně přečištěné sloučeniny s homogenitou alespoň 90 - 95%, lépe s homogenitou 98-99% nebo vyšší. Po přečištění na požadovanou

homogenitu může být polypeptid použit (například jako imunogen pro produkci protilátek).

Odborníkům v oboru bude známo, že po chemické syntéze, biologické expresi nebo po přečištění může mít tumor-supresorový protein takovou konformaci, která se významně liší od přirozené konformace polypeptidů tvořících protein. V tomto případě je nutné denaturovat a redukovat polypeptid a potom složit polypeptid do výhodné konformace. Způsoby pro redukci a denaturaci proteinů a pro indukci opětovného složení jsou v oboru dobře známy (viz Debinsky (1993) J. Biol. Chem. 298: 14065-14070; Kreitman (1993) Bioconjug. Chem. 4: 581-585; a Buchner (1992) Anal. Biochem. 205: 263-270). Debinsky (1993) výše, například, popisuje denaturaci a redukci proteinů inkusních tělísek v guanidin-DTE. Protein je potom znovu složen v redukčním pufru obsahujícím oxidovaný glutathion a L-arginin.

Odborníkům v oboru bude známo, že při obsažení mnoha konzervativních variací v sekvenci nukleových kyselin a polypeptidů vznikne funkčně identický produkt. Například, z důvodů degenerace genetického kodu jsou "silentní substituce" (t.j. substituce sekvence nukleové kyseliny, které nevedou k alteraci kodovaného polypeptidu) předpokládaným rysem každé sekvence nukleové kyseliny, která koduje aminokyselinu. Podobně, při "konzervativní aminokyselinové substituci" jedné nebo několika aminokyselin v sekvenci nukleové kyseliny, při kterých jsou substituovány aminokyseliny s podobnými vlastnostmi (viz definice uvedená výše), vzniká sekvence, která je také značně podobná popsané aminokyselinové sekvenci, nebo popsané sekvenci nukleové kyseliny, která koduje aminokyselinu. Takové konzervativně substituované variace každé přesně popsané sekvence jsou rysem předkládaného vynálezu.

Odborníkům v oboru bude jasné, že mohou být připraveny modifikace tumor-supresorových proteinů, bez zmenšení jejich biologické aktivity. Mohou být připraveny některé modifikace pro usnadnění klonování, exprese nebo inkorporace cílové molekuly do fúzního proteinu. Takové modifikace jsou dobře známé odborníkům v oboru a patří sem, například, přidání methioninu na amino-konec pro vložení iniciačního místa, nebo přidání aminokyselin (například polyHis) na jeden z konců pro vytvoření výhodně umístěného restrikčního místa nebo terminačních kodonů nebo sekvencí usnadňujících přečištění.

Modifikace nukleových kyselin a polypeptidů mohou být hodnoceny běžnými vyšetřovacími technikami ve vhodných testech na požadovanou charakteristiku. Například, změny imunologického charakteru polypeptidu mohou být určeny vhodným imunologickým testem. Modifikace jiných vlastností, jako je hybridizace nukleové kyseliny na cílovou nukleovou kyselinu, redukční nebo termální stabilita proteinu, hydrofobní charakter, citlivost na proteolýzu, nebo tendence k agregaci, jsou všechny testovány standartními technikami.

D) Přenos tumor-supresorové nukleové kyseliny nebo proteinu do cílových buněk

Tumor-supresorové nukleové kyseliny nebo proteiny podle předkládaného vynálezu mohou být vloženy do buněk buď jako proteiny, nebo jako nukleové kyseliny. Pokud je použit tumor-supresorový protein, tak je produkt exprese tumor-supresorového genu (například p53 nebo RB polypeptid nebo jeho fragment s tumor-supresorovou aktivitou) dopraven do cílových buněk za použití standartních metod pro dopravu proteinů (viz dále). Alternativně, pokud je použita tumor-supresorová nukleová

29.10.99

kyselina (například gen, cDNA, mRNA atd.), tak je nukleová kyselina vložena do buněk za použití běžných technik pro přenos nukleových kyselin do buněk. Tyto techniky obvykle zahrnují metody in vivo nebo ex vivo genové terapie, jak jsou popsány dále. Zejména výhodnou technikou pro přenos p53 a RB je přenos v lipidech nebo liposomech a/nebo použití retrovirových nebo adenovirových vektorů.

1. Genová terapie in vivo

Ve výhodném provedení jsou tumor-supresorové nukleové kyseliny (například cDNA kodující tumor-supresorový protein) klonovány do vektorů pro genovou terapii, které jsou kompetentní s transfektovanými buňkami (jako jsou lidské nebo jiné savčí buňky) in vitro a/nebo in vivo.

Pro vložení nukleových kyselin do buněk in vivo, ex vivo a in vitro bylo použito několik přístupů. Patří mezi ně přenos na bázi liposomů (WO 96/18372; WO 93/24640; Mannino (1988) BioTechniques 6(7): 682-691; U.S. patent č. 5279833; WO 91/06309; a Flegner (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7414) a replikace-defektní retrovirové vektory nesoucí sekvenci terapeutického polynukleotidu jako část retrovirového genomu (viz například Miller (1990), Mol. Cell Biol. 10: 4239 (1990); Kolberg (1992) J. NIH Res. 4: 43 a Cornetta (1991) Hum. Gene Ther. 2: 215).

Pro přehled postupů genové terapie viz například Zhang (1996) Cancer Metastasis Rev 15: 385-401; Anderson, Science (1992) 256: 808-813; Nabel (1993) TIBTECH 11: 211-217; Mitani (1993) TIBTECH 11: 162-166; Mulligan (1993) Science 926-932; Dillon (1993) TIBTECH 11: 167-175; Miller (1992) Nature 357: 455-460; Van Brunt (1988) Biotechnology 6(10): 1149-1154; Vigne

(1995) Restorative Neurology and Neuroscience 8: 35-36; Kremer (1995) British Medical Bulletin 51(1): 31-44; Haddada (1995), Current Topics in Microbiology and Immunology, Doerfler and Bohm (vyd.), Springer-Verlag, Heidelberg, Germany; a Yu (1994) Gene Therapy 1: 13-26.

Vektory použitelné ve způsobech podle předkládaného vynálezu jsou obvykle virové vektory. Mezi použitelné vektory patří rekombinantně modifikované obalené nebo neobalené DNA a RNA viry, výhodně vybrané z baculoviridae, parvoviridae, picornaviridae, herpesviridae, poxviridae, adenoviridae, nebo picornoviridae. Mohou být použity chimerické vektory, které využívají výhodných charakteristik použitých původních vektorů (viz například Feng (1997) Nature Biotechnology 15: 866-870). Takové virové genomy mohou být modifikovány rekombinantními DNA technikami tak, aby obsahovaly tumor-supresorový gen a mohou být upraveny tak, aby nebyly schopné replikace, aby byly schopné podmíněné replikace nebo kompetentní replikace. Ve výhodné provedení vynálezu jsou vektory neschopné replikace nebo jsou schopné podmíněné replikace. Výhodnými vektory jsou vektory odvozené od adenovirových, adeno-asociovaných virových nebo retrovirových genomů. V nejvýhodnějším provedení jsou vektory neschopné replikace odvozené od genomu lidského adenoviru.

Virové vektory schopné podmíněné replikace jsou použity pro dosažení selektivní exprese v určitých typech buněk, za vyloučení nežádoucího širokého spektra infekce. Příklady indukovaně se replikujících vektorů jsou uvedeny v Bischoff et al. (1996) Science 274: 373-376; Pennisi, E. (1996) Science 274: 342-343; Russell, S.J. (1994) Eur. J. of Cancer 30A(8): 1165-1171. Kromě toho, virový genom může být upraven tak, aby obsahoval indukovatelné promotory, které umožňují replikaci

nebo expresi transgenu pouze za určitých podmínek. Příklady indukovatelných promotorů jsou v oboru známé (viz například Yoshida and Hamada (1997) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 230: 426-430; Iida et al., (1996), *J. Virol.* 70(9): 6054-6059; Hwang et al., (1997) *J. Virol.* 71(9): 7128-7131; Lee et al., (1997), *Mol. Cell Biol.* 17(9): 5097-5105; a Dreher et al., (1997) *J. Biol. Chem.* 272(46): 29364-29371. Transgen může být také pod kontrolou tkáňově specifického promotoru, který umožňuje expresi transgenu pouze v určitém typu buněk.

Mezi používané retrovirové vektory patří ty, které jsou založeny na viru myší leukemie (MuLV), viru leukemie gibbonů (GaLV), viru opičí imunodeficiency (SIV), viru lidské imunodeficiency (HIV) a jejich kombinacích. Viz například Buchscher (1992) *J. Virol.* 66(5): 2731-2739; Johann (1992) *J. Virol.* 66(5): 1635-1640; Sommerfelt (1990), *Virol.* 176: 58-59; Wilson (1989) *J. Virol.* 63: 2374-2378; Miller (1991) *J. Virol.* 65: 2220-2224; Wong-Staal et al., PCT/US94/05700; a Rosenberg and Fauci (1993) ve *Fundamental Immunology*, 3. vydání, Paul (vyd.) Raven Press, Ltd., New York a odkazy zde uvedené, a Yu (1994), výše. Vektory jsou obvykle upraveny tak, aby se rozšířil rozsah působnosti vektoru na buňky, které nejsou infikovány retrovirem odpovídajícím vektoru. Obalový protein viru vesikulární stomatitidy (VSV-G) byl použit pro konstrukci VSV-G-pseudotypizovaných HIV vektorů, které mohou infikovat hematopoetické kmenové buňky (Naldini et al., (1996) *Science* 272: 263 a Akkina (1996) *J. Virol.* 70: 2581).

Vektory odvozené od adeno-asociovaného viru (AAV) jsou také používány k přenosu nukleové kyseliny do cílových buněk, například pro in vitro produkci nukleových kyselin a peptidů a v postupech pro in vivo a ex vivo genovou terapii. Pro přehled AAV vektorů viz Okada (1996) *Gene Ther.* 3: 957 - 964; West

(1987) Virology 160: 68-47; Carter (1989) U.S. patent č. 4797368; Carter et al., WO 93/24641 (1993); Kotin (1994) Human Gene Therapy 5: 793-801; Muzyczka (1994) J. Clin. Invest. 94: 1351. Konstrukce rekombinantních AAV vektorů jsou popsány v mnoha publikacích, včetně Lebkowski, U.S. patent č. 5173414; Tratschin (1985) Mol. Cell. Biol. 5(11): 3251-3260; Tratschin (1984) Mol. Cell Biol. 4: 2072-2081; Hermonat (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6466-6470; McLaughlin (1988) a Samulski (1989) J. Virol. 63: 3822-3828. K buněčným liniím, které mohou být transformovány rAAV patří linie popsané v Lebkowski (1988) Mol. Cell Biol. 8: 3988-3996. K dalším vhodným virovým vektorům patří herpes virus a virus vakcinie.

V zejména výhodném provedení je tumor-supresorový gen exprimován v adenovirovém vektoru vhodném pro genovou terapii. Použití adenovirových vektorů in vivo a pro genovou terapii, je dobře popsáno v odborné a patentové literatuře, například v Hermens (1997) J. Neurosci. Methods., leden, 71(1): 85-98; Zeiger (1996) Surgery 120: 921-925; Channon (1996) Cardiovasc. Res. 32: 962-972; Huang (1996) Gene Ther. 3: 980-987; Zepeda (1996) Gene Ther. 3: 973-979; Yang (1996) Hum. Mol. Genet. 5: 1703-1712; Caruso (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11302-11306; Rothmann (1996) Gene Ther. 3: 919-926; Haecker (1996) Hum. Gene Ther. 7: 1907-1914. Použití adenovirových vektorů je podrobně popsáno ve WO 96/25507. Zejména výhodné adenovirové vektory jsou popsány ve Wills (1994) výše; v USSN 08/328673 a ve WO 95/11984.

Zejména výhodné adenovirové vektory obsahující delecí části nebo celého genu pro protein IX. V jednom provedení obsahují adenovirové vektory delece Ela a/nebo Elb sekvencí. V nejvýhodnějším provedení je adenovirovým konstruktem konstrukt

kodující p53 jako je A/C/N/53 nebo A/M/N/53 (viz například USSN 08/328673 a WO 95/11984).

Také jsou výhodné vektory odvozené od lidského adenoviru typu 2 nebo typu 5. Takové vektory jsou výhodně neschopné replikace díky delecím nebo modifikacím E1a a/nebo E1b kodujících regionů. Jsou možné také další modifikace virového genomu pro dosažení určitých expresních charakteristik nebo pro umožnění opakovaného podání nebo nižší imunitní odpovědi. Výhodnější jsou rekombinantní adenovirové vektory obsahující kompletní nebá částečné delece E4 kodujícího regionu, volitelně za zachování E4 ORF6 a ORF6/7. E3 kodující sekvence může být deletována, ale lépe je zachována. Konkrétně, je výhodné, aby promotorový/operatorový region E3 byl upraven tak, aby byla umožněna vyšší exprese E3 pro dosažení lepšího imunologického profilu pro terapeutické vektory. Nejvýhodnější jsou vektory lidského adenovirovu typu 5 obsahující DNA sekvenci kodující p53 pod kontrolou cytomegalovirového promotoru a trojitě vedoucí sekvence mající E3 pod kontrolou CMV promotoru a obsahující deleci E4 kodujících regionů za zachování E4 ORF6 a ORF6/7. V nejvýhodnějším provedení vynálezu je vektorem ACN53.

Ve výhodném provedení je tumor-supresorovým genem p53 nebo RB. Jak bylo uvedeno výše, klonování a použití p53 je podrobně popsáno ve Wills (1994) výše; v USSN 08/328673, podané 25.10.1994 a ve WO 95/11984.

2. Genová terapie ex vivo

V jednom provedení jsou způsoby podle předkládaného vynálezu použity pro inhibice hyperproliferativních (například neoplastických) buněk u subjektu (například u savce, včetně, bez omezení, krys, myši, skotu, prasat, koní, psů, koček nebo

lidí). Patologické hyperproliferativní buňky jsou charakteristickým rysem onemocnění jako je například Gravesova nemoc, psoriasa, benigní hypertrofie prostaty, Li-Fraumeniho syndrom, karcinom prsu, sarkomy, karcinom močového měchýře, karcinom tlustého střeva, karcinom plic, leukemie, lymfomy a jiná nádorová onemocnění.

Použití způsobů podle předkládaného vynálezu ex vivo umožňuje odstranění patologických hyperproliferativních buněk z vhodného vzorku. Například mohou být způsobem podle předkládaného vynálezu v ex vivo použití odstraněny hyperproliferativní buňky kontaminující prekursorové hematopoetické buňky během rekonstituce kostní dřeně. Obvykle takové metody obsahují získání vzorku od organismu. Vzorek obvykle obsahuje heterogenní populaci buněk, ve které jsou přítomné jak fenotypicky normální, tak patogenní (hyperproliferativní) buňky. Vzorek je kontaktován s tumor-supresorovými nukleovými kyselinami nebo proteiny a adjuvantním protinádorovým činidlem podle předkládaného vynálezu. Tumor-supresorový gen může být podán například ve virovém vektoru, jako je retrovirový vektor nebo adenovirový vektor. Léčba redukuje proliferaci patogenních buněk, což vede k zisku vzorku, který obsahuje vyšší poměr normálních buněk k patogenním buňkám, který může být potom navrácen do organismu.

Transformace buněk ex vivo pro diagnostiku, výzkum nebo pro genovou terapii (například pro zpětnou infusi transformovaných buněk do organismu) je v oboru dobře známá. Ve výhodném provedení jsou izolovány z organismu, jsou transfektovány tumor-supresorovým genem nebo cDNA podle předkládaného vynálezu a jsou podány infusí zpět do organismu (například pacientovi). Různé typy buněk vhodné pro ex vivo transformaci jsou v oboru známy. Zejména výhodnými buňkami jsou progenitorové nebo kmenové buňky (pro popis izolace a kultivace buněk od pacienta

viz například Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 3. vydání, Wiley-Liss, New York, a odkazy zde uvedené). Transformované buňky jsou kultivovány za použití dobře známých technik. Viz též Kuchler (1977) *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*, Kuchler, R.J., Hutchinson and Ross, Inc., a Atlas (1993) *CRC Handbook of Microbiological Media* (Parks ed.) CRC Press, Boca Raton, FL. Savčí buněčné systémy budou obvykle ve formě monovrstvy buněk, ačkoliv mohou být také použity buněčné suspenze. Alternativně mohou být buňky získány z buněk uskladněných v buněčné bance (například krevní bance). Ilustrativní příklady savčích buněčných linií jsou buněčná linie HEC-1-B, VERO a HeLa buňky, buněčná linie z ovaria čínského křečka (CHO), W138, BHK, Cos-7 nebo MDCK buněčné linie (viz například Freshney, výše).

V jednom konkrétním provedení jsou kmenové buňky použity v ex vivo technice pro transformaci buněk a genovou terapii. Výhodou použití kmenových buněk je to, že mohou být diferencovány na jiné buněčné typy in vitro, nebo mohou být vloženy do savce (jako je dárce buněk), kde budou osídlovat kostní dřeň. Způsoby pro diferenciaci kmenových buněk (například CD34+) in vitro na klinicky významné typy imunitních buněk využívající cytokiny jako je GM-CSF, IFN- γ a TNF- α , jsou v oboru dobře známé (viz například Inaba (1992) *J. Exp. Med.* 176: 1693-1702; Szabolcs (1995) 154: 5851-5861).

V některých postupech ex vivo jsou také kromě kmenových buněk používány T buňky a B buňky. Je známo několik technik pro izolaci T a B buněk. Exprese povrchových markerů usnadňuje izolaci a přečištění takových buněk. Mezi způsoby pro identifikaci a izolaci buněk patří FACS, inkubace ve zkumavkách s fixovanými protilátkami, které se váží na určitý typ buněk, a panoramování s magnetickými korálky.

Kmenové buňky jsou izolovány pro přenos a diferenciaci pomocí známých technik. Nypříklad, u myši jsou buňky kostní dřeně izolovány usmrcením myši a rozříznutím kostí končetin. Kmenové buňky jsou izolovány z buněk kostní dřeně panoramováním buněk kostní dřeně s protilátkami, které se váží na nežádoucí buňky, jako jsou CD4⁺ a CD8⁺ (T buňky), CD45⁺ (panB buňky), GR-1 (granulocyty) a Ia^d (diferencované antigen-presentující buňky). Tento protokol je uveden například v Inaba (1992), výše.

U lidí se provede aspirace kostní dřeně z crista iliaca, například v celkové anestezii na operačním sále. Aspirát kostní dřeně má objem přibližně 1000 ml a je odebrán ze zadní části os ilium a crista iliaca posterior. Pokud je celkové množství buněk nižší než $2 \times 10^8/\text{kg}$, provede se druhá aspirace ze sternu a z crista iliaca anterior. Během operace jsou podány ozářené erytrocyty, pro nahrazení objemu kostní dřeně odebrané aspirací. Lidské hematopoetické progenitorové a kmenové buňky jsou charakterizovány přítomností povrchového membránového antigenu CD34. Tento antigen je použit pro přečištění, například na afinitních kolonách, která vážou CD34. Po odběru kostní dřeně jsou mononukleární buňky separovány od dalších složek centrifugací s fukolovým gradientem. Toto může být provedeno semi-automatizovanou technikou za použití separátoru buněk (například baxter Fenwal CS3000+ nebo Terumo přístroje). Buňky s nízkou hustotou, které se skládají hlavně z mononukleárních buněk, jsou odebrány a inkubují se v plastových zkumavkách při 37 °C po dobu přibližně 1,5 hodiny. Adherující buňky (monocyty, makrofágy a B-buňky) jsou odstraněny. Neaderující buňky jsou potom odebrány a inkubují se s monoklonální protilátkou proti CD34 (například s myši protilátkou 9C5) při 4 °C po dobu 30 minut s mírným třepáním.

29.10.99

Konečná koncentrace anti-CD34 protilátky je výhodně přibližně 10 µg/ml. Po dvou promytích se do suspenze buněk přidají paramagnetické mikrosféry (například Dyna Beads, dodávané Baxter Immunotherapy Group, Santa Ana, California) potažené ovčí (Fc) protilátkou proti myšimu IgG, v poměru přibližně 2 buňky na korálek. Po další inkubaci po dobu 30 minut při přibližně 4 °C se rozety buněk s magnetickými korálky odeberou pomocí magnetu. Pro uvolnění korálek od CD34+ buněk se přidá chymopapain (Baxter Immunotherapy Group, Santa Ana, California) v konečné koncentraci 200 U/ml.

Alternativně a výhodně může být použit postup izolace na afinitní koloně, která se váže na CD34 nebo na protilátku navázanou na CD34 (viz například Ho (1995) Stem Cells (13 (suppl. 3): 100-105 a Brenner (1993) Journal of Hematotherapy 2: 7-17).

V jiném provedení mohou být hematopoetické kmenové buňky izolovány z pupečnickové krve. Yu (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 699-703, popisuje výhodnou metodu pro transdukcii CD34+ buněk z lidské fetální pupečnickové krve za použití retrovirových vektorů.

3. Podání tumor-supresorových nukleových kyselin: Vektory a expresní kazety

Způsoby podání

Expresní kazety a vektory (například retroviry, adenoviry, liposomy) obsahující terapeutické tumor-supresorové nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu mohou být podány přímo do organismu pro přenos do buněk in vivo. Podání je provedeno jakoukoliv technikou, která je běžně používána pro kontaktování

molekul s buňkami krve nebo tkání, jako je například systémové podání, regionální nebo lokální podání, jak jsou podrobně popsána výše pro podání adjuvantního protinádorového činidla. "Balík" nukleových kyselin (minimálně tumor-supresorová kodující sekvence s promotorem) je podán vhodným způsobem, výhodně s farmaceuticky přijatelnými nosiči, jak jsou také popsány výše. Vhodné metody pro podání takových nukleových kyselin jsou dostupné a dobře známé v oboru a ačkoliv mohou být použity různé způsoby, může určitý způsob dosáhnout časnější a účinnější účinek než jiný.

Například, podání rekombinantního adenovirového vektoru zpracovaného tak, aby exprimoval tumor-supresorový gen, může vyvolat imunitní odpověď, zejména protilátkovou odpověď, proti adenovirovému vektoru. U některých pacientů mohou být již předem přítomné protilátky proti adenoviru. Proto je za určitých okolností optimální a nejúčinnější regionální nebo lokální podání adenovirového vektoru exprimujícího tumor-supresorový gen. Například, jak je uvedeno dále, karcinom ovaria omezený na dutinu břišní je jednou klinickou situací, ve které je výhodnou léčbou regionální terapie p53 genem, t.j. intraperitoneální (IP) aplikace. IP podání adenovirového vektoru také vede k infekci peritonea a k absorpci adenovirového vektoru do systémové cirkulace (jiné způsoby regionálního podání také vedou k průniku adenovirového vektoru do systémové cirkulace). Rozsah tohoto účinku závisí na koncentraci a/nebo celkovém množství virových částí podaných IP. Pokud je žádoucí systémový účinek, pak je výhodné podávání vyšších koncentrací po dobu několika následujících dnů.

Lokální podání adenovirového vektoru exprimujícího tumor-supresorový gen je také výhodné za určitých okolností, například tehdy, pokud jsou u pacienta přítomny protilátky

proti adenoviru. Takové lokální podání může být například intratumorální injekce, pokud se jedná o vnitřní podání, nebo aplikace na sliznici, pokud se jedná o zevní podání. Alternativně může být lokální podání provedeno pomocí zacílení adenovirového vektoru na nádor, například za použití činidel rozpoznávajících nádorově specifické antigeny (jako jsou protilátky) na liposomech nebo na adenoviru samotném.

Prostředky

Farmaceuticky přijatelné nosiče jsou určeny částečně charakterem určitého podaného prostředku, stejně jako určitým způsobem podání. V souladu s tím existuje velké množství vhodných prostředků podle předkládaného vynálezu.

Prostředky vhodné pro orální podání farmaceutických prostředků obsahujících tumor-supresorové nukleové kyseliny zahrnují (a) kapalně roztoky, jako je například účinné množství nukleové kyseliny v ředidlu, jako je voda, salinický roztok nebo PEG 400; (b) kapsle, sáčky s práškem nebo tablety, které obsahují předem určené množství aktivní složky, jako jsou kapaliny, pevné látky, granule nebo želatina; (c) suspenze ve vhodné kapalině; a (d) vhodné emulze. Tablety mohou obsahovat laktosu, sacharosu, mannit, sorbitol, fosforečnan vápenatý, kukuřičný škrob, bramborový škrob, tragant, mikrokrytalickou celulosu, arabskou klovatinu, želatinu, koloidní oxid křemičitý, kroskarmelosu sodnou, talek, stearan hořečnatý, kyselinu stearovou a další přísady, barviva, plnidla, pojiva, ředidla, pufrovací činidla, zvlhčující činidla, konzervační činidla, chuťová korigens, barviva, činidla podporující rozpadavost a farmaceuticky přijatelné nosiče. Medicínské oplatky obsahují aktivní složku v ochucené bazi, obvykle v sacharose a arabské klovatině nebo tragantu, a pastilky

obsahují aktivní složku v inertní bazi, jako je želatina a glycerin nebo sacharosa a arabská klovatina, a emulze, gely a podobně obsahují kromě aktivní složky známé nosiče.

Nukleové kyseliny, samostatně nebo v kombinaci s dalšími vhodnými složkami, mohou být vyrobeny v aerosolovém prostředí (t.j., mohou být nebulizovány) tak, aby mohly být podány inhalačně. Aerosolové prostředky mohou být obsaženy v tlakovaném přijatelném hnacím plynu, jako je dichlordifluormethan, propan, dusík a podobně.

Mezi vhodné prostředky pro rektální podání patří například čípky, které se skládají z připravené nukleové kyseliny a čípkové baze. Mezi vhodné čípkové baze patří přirozené nebo syntetické triacylglyceridy nebo parafinové uhlovodíky. Kromě toho je také možné použití želatinových rektálních kapslí, které se skládají z kombinace připravené nukleové kyseliny s bází, jako jsou například kapalné triacylglyceridy, polyethylenglykoly a parafinové uhlovodíky.

Mezi vhodné prostředky pro parenterální podání, jako je například intraartikulární (nitrokloubní), intravenosní, intramuskulární, intradermální, intraperitoneální a subkutánní, patří například vodné a nevodné izotonické sterilní injekční roztoky, které mohou obsahovat antioxidační činidla, pufrovací činidla, bakteriostatická činidla a činidla pro úpravu izotonicity s krví příjemce, a vodné nebo nevodné sterilní suspenze, které mohou obsahovat suspendační činidla, solubilizační činidla, zahušťovací činidla, stabilizační činidla a konzervační činidla. Ve způsobech podle předkládaného vynálezu mohou být prostředky podány například intravenosní infusí, orálně, lokálně, intraperitoneálně, intravesikálně nebo intrathekálně. Výhodnými způsoby podání jsou parenterální

podání a intravenosní podání. Prostředky obsahující nukleové kyseliny mohou být připraveny v zásobnících pro jednu dávku nebo pro více dávek, jako jsou například ampulky nebo lékovky.

Prostředky podle předkládaného vynálezu ve formě injekčních roztoků nebo suspenzí mohou být připraveny ze sterilních prášků, granulí nebo tablet známými způsoby. Přesné složení prostředku, koncentrace činidel a nukleové kyseliny v prostředku, pH prostředku, pufrů a jiné parametry se budou lišit podle způsobu a místa podání (například podle systémového, regionálního nebo lokálního podání) a podle potřeb skladování, manipulace, transportu a životnosti určitého farmaceutického prostředku. Optimalizace těchto parametrů pro určité potřeby prostředku může být provedena rutiními metodami; a může být použita jakékoliv přísada a parametr, který je používán pro injekční roztoky. Příkladem vhodného prostředku je rekombinantní adenovirový vektor exprimující přirozený p53 (rAd5/p53) v koncentraci přibližně $7,5 \times 10^{11}$ až $7,5 \times 10^{10}$ částic na ml, monohydrat fosforečnanu sodného v koncentraci 0,42 mg/ml, bibazický anhydrid fosforečnanu sodného v koncentraci 2,48 mg/ml, chlorid sodný v monohydratu fosforečnanu sodného v koncentraci 5,8 mg/ml, sacharosa v koncentraci 20,0 mg/ml, hexahydrat chloridu hořečnatého v koncentraci 0,40 ml/ml, obvykle v celkovém objemu 1,0 ml.

Buňky s přenesenou nukleovou kyselinou, jak jsou popsány výše v souvislosti s genovou terapií ex vivo, mohou být také podány intravenosně nebo parenterálně, jak je popsáno výše.

Dávka podaná pacientovi ve způsobech podle předkládaného vynálezu by měla být dostatečná pro požadovaný terapeutický účinek u pacienta. Dávka bude určena podle účinnosti určitého použitého vektoru a podle stavu pacienta, stejně jako podle

tělesné hmotnosti nebo tělesného povrchu léčeného pacienta. Dávka bude také záviset na existenci, charakteru a rozsahu jakýchkoliv nežádoucích účinků, které jsou spojeny s podáním urřčitého vektoru nebo transformovaných buněk určitému pacientovi.

Při stanovení účinného množství vektoru, které má být podáno při léčbě, bude lékař hodnotit plasmatické koncentrace cirkulujícího vektoru, toxicitu vektoru, progresi onemocnění a produkci protilátek proti vektoru. Obvyklá dávka nukleové kyseliny je značně závislá na způsobu podání o systému pro genový přenos. V závislosti na způsobu podání se dávka pohybuje v rozmezí od 1 μg do 100 mg nebo více. Obecně je dávkový ekvivalent holé nukleové kyseliny z vektoru od přibližně 1 μg do 100 μg pro obvyklého 70 kg pacienta a dávky vektorů, které obsahují virové částice, jsou vypočítány tak, aby dodaly ekvivalentní množství terapeutické nukleové kyseliny.

Při podání mohou být transformované buňky podle předkládaného vynálezu podány rychlostí určenou LD_{50} vektoru nebo transformovaného typu buněk a vedlejšími účinky vektoru nebo buněčného typu v různých koncentracích, při dané hmotnosti a celkovém zdravotním stavu pacienta. Podání může být provedeno v jedné dávce nebo v dělených dávkách, jak je popsáno dále.

Ve výhodném provedení jsou před infusí odebrány vzorky krve a jsou uskladněny pro analýzu. Pečlivě se sledují vitální příznaky a saturace kyslíkem pomocí pulsní oxymetrie. Vzorky krve jsou výhodně odebrány 5 minut před a 1 hodinu po infusi a jsou uskladněny pro analýzu. Při terapii ex vivo může být leukoferesa, transformace a reinfuse provedena každé 2 až 3 měsíce. Při první léčbě může být infuse provedena ambulantně

pod dohledem lékaře. Pokud je reinfuse podávána ambulantně, pak je pacient sledován po dobu nejméně 4, lépe 8 hodin po terapii.

Jak je uvedeno výše, mohou být adenovirové konstrukty podány systémově (například intravenosně), regionálně (například intraperitoneálně) nebo lokálně (například intra- nebo peritumorální nebo intracystickou injekcí, například při léčbě karcinomu močového měchýře). Zejména výhodným způsobem podání je intraarteriální injekce, lépe injekce do a. hepatica (například pro léčbu nádorů jater), nebo při léčbě mozkových nádorů podání do a. carotis nebo do arterie náležící do systému karotických arterií (například do a. occipitalis, a. auricularis, a. temporalis, mozkové arterie, a. maxilaris, atd.). Podání při léčbě karcinomu plic může být provedeno například pomocí bronchoskopu. Typicky je takové podání provedeno za použití vodného farmaceuticky přijatelného pufru, jak jsou popsány výše. Nicméně, v jednom výhodném provedení jsou adenovirové konstrukty nebo expresní kazety obsahující tumor-supresorový gen podány v lipidovém prostředí, přesněji buď v komplexu s liposomy jako komplexy lipid/nukleová kyselina (například Debs and Zhu (1993) WO 93/24640; Mannino (1988, výše; Rose, U.S. patent č. 5279833; Brigham (1991) WO 91/06309; a Felgner (1987), výše), nebo jsou enkapsulované v liposomech, přesněji v imunoliposomech cílených na specifické nádorové markery. Mělo by být jasné, že takové lipidové prostředky mohou být také podány lokálně, systémově nebo v aerosolu.

4. Zesílení přenosu tumor-supresorového genu

Přenos tumor-supresorového genu může být zesílen použitím jednoho nebo více "činidel zesilujících přenos". Termín "činidlo zesilující přenos" označuje jakékoliv činidlo, které zvyšuje přenos terapeutického genu, jako je tumor-supresorový

gen, do nádorové tkáně nebo orgánu. Takového zesílení přenosu může být dosaženo různými prostředky. Jeden takový mechanismus obsahuje narušení ochranné glykosaminoglykanové vrstvy na epitelovém povrchu orgánu nebo tkáně (například močového měchýře). Příklady takových činidel zesilujících přenos jsou detergenční činidla, alkoholy, glykoly, surfaktanty, soli žlučových kyselin, antagonisté heparinu, inhibitory cyklooxygenasy, hypertonické roztoky solí a acetaty. Alkoholy zahrnují například alifatické alkoholy jako je ethanol, N-propanol, isopropanol, butylalkohol, acetylalkohol. Glykoly zahrnují glycerin, propylenglykol, polyethylenglykol a další glykoly s nízkou molekulovou hmotností jako je glycerol a thioglycerol. Acetaty jako je kyselina octová, glukonolacetat a octan sodný jsou dalšími příklady činidel zesilujících přenos. Hypertonické roztoky solí, jako je 1M NaCl, jsou také příklady činidel zesilujících přenos. Příklady surfaktantů jsou dodecylsírán sodný (SDS) a lysolecitin, polysorbat 80, nonylfenoxypolyoxyethylen, lysofosfatidylcholin, polyethylenglykol 400, polysorbat 80, ethery polyoxyethylenů, polyglykoetherové surfaktanty a DMSO. Také mohou být použity soli žlučových kyselin jako je taurocholat, taurodeoxycholat sodný, deoxycholat, chenodeoxycholat, kyselina glykocholová, kyselina glykochenodeoxycholová a další adstringens jako je dusičnan stříbrný. Také mohou být použity antagonisté heparinu jako jsou kvarterní aminy jako je prolaminsulfat. Mohou být použity inhibitory cyklooxygenasy, jako je salicylat sodný, kyselina salicylová, a nesteroidní antirevmatika (NSAID) jako je indometacin, naproxen, diklofenak.

Detergenční činidla zahrnují aniontová, kationtová, obojetná a neiontová detergenční činidla. Příklady detergenčních činidel jsou taurocholat, deoxycholat, taurodeoxycholat, cetylpyridium, benzalkoniumchlorid, ZWITTERGENT[®]3-14, CHAPS (3[(3-

cholamidopropyl)dimethylammoniol]-1-propansulfonathydrat, Aldrich), Big CHAP (jak je popsáno v USSN 08/889355, podané 8.6.1997; a v Mezinárodní přihlášce WO 97/25072, 17.6.1997), Deoxy Big CHAP (ibid), TRITON®-X-100 detergenční činidlo, C12E8, oktyl-B-D-glukopyranosid, PLURONIC®-F68 detergenční činidlo, TWEEN®20 detergenční činidlo a TWEEN®80 detergenční činidlo (CALBIOCHEM® Biochemicals).

V jednom provedení je činidlo zesilující přenos obsaženo v pufru, ve kterém je připraven rekombinantní adenovirový vektorový systém pro přenos. Činidlo zesilující přenos může být podáno před podáním rekombinantního viru nebo současně s virem. V některých provedeních je činidlo zesilující přenos podáno s virem, kdy prostředek obsahující virus je smísen s činidlem zesilujícím přenos těsně před podáním pacientovi. V jiných provedeních jsou činidlo zesilující přenos a virus obsaženy v jedné ampulce pro podání.

V případě farmaceutický prostředků obsahujících tumor-supresorový gen obsažený v rekombinantním adenivirovém vektorovém systému v pufru, které dále obsahují činidlo zesilující přenos, je farmaceutický prostředek výhodně podán během 5 minut až 3 hodin, lépe během 10 minut až 120 minut a nejlépe během 15 minut až 90 minut. V jiném provedení může být činidlo zesilující přenos podáno před podáním rekombinantního adenovirového vektorového systému obsahujícího tumor-supresorový gen. Podání činidla zesilujícího přenos může být provedeno 30 sekund až jednu hodinu, lépe 1 minutu až 10 minut a nejlépe 1 minutu až 5 minut před podáním adenovirového vektorového systému obsahujícího tumor-supresorový gen.

Koncentrace činidla zesilujícího přenos bude záviset na mnoha faktorech, které jsou odborníkům známy, jako je typ použitého činidla zesilujícího přenos, pufru, pH, cílové tkáni nebo orgánu a způsobu podání. Koncentrace činidla zesilujícího přenos bude v rozmezí od 1% do 50% (obj./obj.), lépe od 10% do 40% (obj./obj.) a nejlépe od 15% do 30% (obj./obj.). Výhodně bude koncentrace detergenčního činidla v konečném podaném prostředku přibližně 0,5 - 2-násobek kritické micelizační koncentrace (CMC). Výhodná koncentrace Big CHAP je přibližně 2 - 20 mM, lépe přibližně 3,5 - 7 mM.

Pufrem obsahujícím činidla zesilujícího přenos může být jakýkoliv farmaceutický pufr, jako je fosfatem pufovaný salinický roztok nebo fosforečnan sodný/síran sodný, Tris pufr, glycinový pufr, sterilní voda a jiné pufry známé v oboru, jak jsou popsány například v Good et al., (1966), Biochemistry 5: 467. pH pufru ve farmaceutickém prostředku obsahujícím tumor-supresorový gen obsažený v rekombinantním adenivirovém vektorovém systému může být v rozmezí od 6,4 do 8,4, lépe od 7 do 7,5 a nejlépe od 7,2 do 7,4.

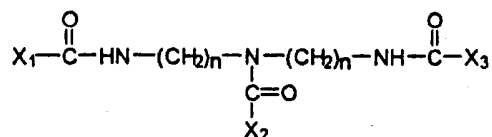
Výhodný prostředek pro podání rekombinantního adenoviru obsahuje přibližně 10^9 - 10^{11} PN/ml viru, přibližně 2 - 10 mM Big CHAP nebo přibližně 0,1 - 1,0 nM TRITON®-X-100 detergenčního činidla, ve fosfatem pufovaném salinickém roztoku (PBS) a přibližně 2 - 3% sacharosy (hmot./obj.) a přibližně 1 - 3 mM $MgCl_2$, při pH přibližně 6,4 - 8,4. Použití činidel zesilujících přenos je podrobně popsáno v související přihlášce USSN 08/779627, podané 7.1.1997.

V prostředcích obsahujících přípravky Big CHAP pro zlepšení genového přenosu nukleových kyselin je koncentrace Big-CHAP závislá na jeho komerčním zdroji. Pokud je Big-CHAP získán od

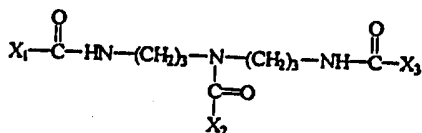
CALBIOCHEM, je jeho koncentrace výhodně v rozmezí od 2 do 10 mmol. Lépe je tato koncentrace 4 až 8 mmol. Nejlepší koncentrace je 7 mmol.

Pokud je Big-CHAP získán od Sigma, je jeho koncentrace výhodně v rozmezí od 15 do 35 mmol. Lépe je tato koncentrace 20 až 30 mmol. Nejlepší koncentrace je přibližně 25 mmol.

V dalším provedení vynálezu jsou poskytnuta činidla zesilujícího přenos mající vzorec I:



kde n je celé číslo od 2 do 8, X_1 je skupina kyseliny cholové nebo skupina kyseliny deoxycholové a X_2 a X_3 jsou každý nezávisle vybrány ze skupiny skládající se ze skupiny kyseliny cholové, skupiny kyseliny deoxycholové a sacharidové skupiny. Alespoň jeden z X_2 a X_3 je sacharidová skupina. Sacharidová skupina může být vybrána ze skupiny skládající se z pentosamonosacharidových skupin, hexosamonosacharidových skupin, pentosa-pentosa disacharidových skupin, hexosa-hexosa disacharidových skupin, pentosa-hexosa disacharidových skupin a hexosa-pentosa disacharidových skupin. V jednom výhodném provedení mají sloučeniny podle předkládaného vynálezu vzorec II:



kde X_1 a X_2 jsou vybrány ze skupiny skládající se ze skupiny kyseliny cholové a skupiny kyseliny deoxycholové a X_3 je sacharidová skupina.

Tyto sloučeniny jsou v prostředcích podle předkládaného vynálezu výhodně použity v koncentracích přibližně 0,002 až 2 mg/ml, lépe přibližně 0,02 až 2 mg/ml a nejlépe přibližně 0,2 až 2 mg/ml. Nejvýhodnější koncentrace je přibližně 2 mg/ml.

Fosfatem pufovaný salinický roztok (PBS) je výhodným solubilizačním činidlem pro tyto sloučeniny. Nicméně, odborníkům v oboru bude jasné, že pro dosažení požadované solubility těchto sloučenin v různých farmaceutických prostředcích může být žádoucí přidání dalších přísad nebo pomocných činidel. Například mohou být přidána dobře známá solubilizační činidla, jako jsou detergenční činidla, estery mastných kyselin, surfaktanty, ve vhodných koncentracích, pro usnadnění solubilizace sloučenin v různých rozpouštědlech. Pokud je rozpouštědlem PBS, pak je výhodným solubilizačním činidlem Tween 80 v koncentraci přibližně 0,15%.

5. Podání tumor-supresorových proteinů

Tumor-supresorové proteiny (polypeptidy) mohou být podány injekčně přímo do nádoru, nebo mohou být podány systémově, jak je popsáno výše. Ve výhodném provedení jsou tumor-supresorové proteiny kombinovány s farmaceuticky přijatelným nosičem (přísadou) za vzniku farmaceutického prostředku, jak je popsán výše. Tumor-supresorový polypeptid je podán v terapeuticky účinné dávce. Tak je prostředek podán v dávce, která je dostatečná pro vyléčení nebo alespoň částečné zastavení onemocnění a/nebo jeho komplikací. Účinné množství pro tento účel závisí na závažnosti onemocnění a na celkovém zdravotním stavu pacienta.

Je jasné, že tumor-supresorové polypeptidy, pokud jsou podány orálně, musí být chráněny před trávením. Toto chránění je obvykle provedeno vytvořením komplexu polypeptidu s prostředkem, který je činí resistantním na kyselou nebo enzymatickou hydrolýzu, nebo obalením polypeptidu vhodným resistantním nosičem, jako jsou například liposomy popsané výše. Prostředky pro chránění polypeptidů při orálním podání jsou v oboru dobře známe (viz například U.S. patent č. 5391377, který popisuje liposomové prostředky pro orální podání terapeutických činidel).

III. Kombinované farmaceutické prostředky

Tumor-supresorové činidlo a adjuvantní protinádorové činidlo mohou být podány separovaně, kdy je buď tumor-supresorová nukleová kyselina či polypeptid podán před adjuvantním protinádorovým činidlem (předléčení tumor-supresorovým činidlem), nebo je adjuvantní protinádorové činidlo podáno před tumor-supresorovou nukleovou kyselinou či polypeptidem (předléčení protinádorovým činidlem). Tumor-supresorová nukleová kyselina a/nebo polypeptid a adjuvantní protinádorové činidlo mohou být samozřejmě podány simultáně.

V jednom provedení jsou tumor-supresorová nukleová kyselina a/nebo polypeptid a adjuvantní protinádorové činidlo podány v jednom farmaceutickém prostředku. V tomto provedení mohou být tumor-supresorová nukleová kyselina a/nebo polypeptid a adjuvantní protinádorové činidlo suspendovány a/nebo solubilizovány v jednom homogenním vehikulu. Alternativně, tumor-supresorová nukleová kyselina a/nebo polypeptid a adjuvantní protinádorové činidlo mohou být suspendovány nebo solubilizovány v různých vehikulech, která jsou nakonec

suspendována v jedné pomocné přísadě, buď v době podání, nebo trvale. Například, adjuvantní protinádorové činidlo může být solubilizováno v polárním rozpouštědle (například paclitaxel v ethanolu) a tumor-supresorová nukleová kyselina může být v komplexu s lipidem a obě složky jsou společně uskladněny v suspenzi, nebo jsou smíseny v době podání.

IV. Léčebný režim: kombinovaná a individuální terapie

A) Léčebný režim pro tumor-supresorové činidlo

Objevem předkládaného vynálezu je, že tumor-supresorové nukleové kyseliny nebo polypeptidy, přesněji tumor-supresorové nukleové kyseliny, mají vyšší účinnost v inhibici nádorového růstu, pokud jsou podány v opakovaných dávkách, než když jsou podány v jedné dávce. Vynález proto obsahuje léčebný režim pro tumor-supresorový gen nebo polypeptid, který obsahuje opakovaná podání tumor-supresorové nukleové kyseliny nebo polypeptidu.

Tumor-supresorový protein nebo tumor-supresorová nukleová kyselina může být podána v celkové dávce (s nebo bez adjuvantního protinádorového činidla) v rozmezí od přibližně 1×10^9 do přibližně 1×10^{14} , lépe od přibližně 1×10^9 do přibližně $7,5 \times 10^{15}$, lépe od přibližně 1×10^{11} do přibližně $7,5 \times 10^{13}$ adenovirových částic v jednom z následujících léčebných režimů: celá dávka v jedné dávce, celá dávka podaná denně během 5 dnů nebo podaná během 5 dnů, celá dávka podaná denně během 15 dnů nebo podaná během 15 a celá dávka podaná denně během 30 dnů nebo podaná během 30 dnů. Tento způsob podání může být opakován dvakrát nebo vícekrát (nejlépe třikrát) a cykly jsou podány s odstupem tří až čtyř týdnů. Léčba může obsahovat jeden cyklus nebo více cyklů, výhodně v rozmezí od 2 do 12, nejlépe od 2 do 6 cyklů.

Zejména výhodným léčebným režimem je celková dávka rozdělená do 5 dnů a podávaná denně, celková dávka rozdělená do 15 dnů a podávaná denně a celková dávka rozdělená do 30 dnů a podávaná denně.

V některých výhodných režimech může být denní dávka od $7,5 \times 10^9$ do $7,5 \times 10^{15}$, výhodně od 1×10^{12} do $7,5 \times 10^{13}$ adenovirových částic podávána každý den po dobu až 30 dnů (například režim trvající 2 dny, 2 až 5 dnů, 7 dnů, 14 dnů nebo 30 dnů, kdy stejná dávka je podávána každý den. Režimy obsahující více dávek mohou být opakovány v cyklech trvajících 21 až 28 dnů.

V některých provedeních povedou různé způsoby podání k použití různých výhodných dávek. Například, pro intraarteriální podání do a. hepatica je výhodná dávka v rozmezí od $7,5 \times 10^9$ do 1×10^{15} , lépe od 1×10^{11} do $7,5 \times 10^{13}$ adenovirových částic za den po dobu 5 až 14 dnů. Tyto režimy mohou dále obsahovat podání adjuvantních protinádorových činidel, například FUDR nebo 5'-deoxy-5-fluoruridinu (5'-DFUR) nebo hydrochloridové soli irinotekanu (CPT-11; 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]karbonyloxycamptothecin). Pro intratumorální podání je výhodná dávka v rozmezí od $7,5 \times 10^9$ do 1×10^{13} , lépe od 1×10^{11} do $7,5 \times 10^{12}$ adenovirových částic za den. Pro intraperitoneální podání je výhodná dávka v rozmezí od $7,5 \times 10^9$ do 1×10^{15} , lépe od 1×10^{11} do $7,5 \times 10^{13}$ adenovirových částic za den.

B) Léčebné režimy pro kombinovanou terapii

Pokud je tumor-supresorové činidlo použito v kombinaci s adjuvantním protinádorovým činidlem, tak je tumor-supresorová

nukleová kyselina podána ve výše uvedené dávce. V kombinaci je adjuvantní protinádorové činidlo použito v celkové dávce, která je závislá na použitém činidle. Například, paclitaxel nebo deriváty paclitaxelu jsou podány v celkové dávce v rozmezí od 75 - 350 mg/m² během 1 hodiny, 3 hodin, 6 hodin nebo 24 hodin v léčebném režimu vybraném z podání v jedné dávce, dávce podané v den 1 a 2, dávce podané v den 1, 2 a 3, denní dávce podané v 15 dnech, denní dávce podané ve 30 dnech, denní kontinuální infuse po dobu 15 dnů a denní kontinuální infuse po dobu 30 dnů. Výhodná dávka je 100 - 250 mg/m² za 24 hodin.

Předléčení adjuvantním protinádorovým činidlem (například paclitaxelem) před podáním tumor-supresorové nukleové kyseliny zvyšuje účinnost tumor-supresorové nukleové kyseliny. Proto je v jednom výhodném provedení buňka, tkáň nebo organismus předléčen adjuvantním protinádorovým činidlem před podáním tumor-supresorové nukleové kyseliny. Podání adjuvantního protinádorového činidla výhodně předchází podání tumor-supresorové nukleové kyseliny o přibližně 24 hodin, ačkoliv kratší nebo delší období je také přijatelné.

Předléčení je zejména výhodné tehdy, pokud je adjuvantním protinádorovým činidlem sloučenina podobná paclitaxelu, lépe paclitaxel nebo derivát paclitaxelu (například Taxol® nebo Taxotere®). Zejména výhodnými tumor-supresorovými činidly jsou RB a p53 a nejvýhodnější je p53, nejlépe p53 v adenovirovém vektoru (například A/C/N/53).

V. Léčba a profylaxe metastas

Jak je uvedeno v příkladech 2 a 3, léčba tumor-supresorovým (například p53) genem je účinná v léčbě lidských nádorových buněk in vitro, v léčbě xenotransplantátů lidských nádorů u

imunokompromitovaných hostitelů a v léčbě lidských nádorů plic (in vivo). Chirurgické odstranění primárních nádorů u pacientů často vede k recidivě nádoru v primárním místě a k metastazování nádoru z tohoto místa, které je způsobeno mikroskopickými "hnízdý" nádorových buněk, která jsou chirurgem ponechána v těle. Alternativně může být pro zajištění odstranění primárního nádoru proveden mutilující zákrok, při kterém je odstraněno velké množství normální tkáně sousedící s místem primárního tumoru.

V jiném provedení vynález obsahuje způsob pro inhibici růstu a/nebo proliferace metastas (metastatických buněk). Způsob obecně obsahuje buď systémové, nebo lokální podání tumor-supresorového činidla, lépe lokální podání p53 nebo RB.

A) Systémová léčba

Jak je uvedeno v příkladech 2 a 3, systémová léčba (například intravenosní injekce) vektorů obsahujících tumor-supresorovou nukleovou kyselinu (například A/C/N/53) inhibuje progresi metastas in vivo. Proto v jednom provedení vynález obsahuje způsob pro inhibici progrese metastas, při kterém je organismu podána tumor-supresorová nukleová kyselina a/nebo tumor-supresorový polypeptid, jak jsou popsány výše. Tumor-supresorovým činidlem je výhodně tumor-supresorová nukleová kyselina, lépe p53 tumor-supresorová nukleová kyselina a nejlépe p53 nukleová kyselina v adenovirovém vektoru (například A/C/N/53). V jiném výhodném provedení je tumor-supresorová nukleová kyselina obsažena v liposomech nebo je v komplexu s lipidem (viz například Debs and Zhu (1993) WO 93/24640; Mannino and Gould-Fogerite (1988) BioTechniques 6(7): 682-691; Rose, U.S. patent č. 5279833; Brigham (1991) WO 91/06309; a Felgner et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7414).

B) Lokální léčba

V jiném provedení je lokální aplikace tumor-supresorového proteinu nebo tumor-supresorové nukleové kyseliny provedeno spolu s chirurgickým zákrokem. V tomto provedení je tumor-supresorové činidlo, výhodně ve formě infekčního vektoru, aplikováno do chirurgické rány po odstranění tumoru. Infekční částice vnesou p53 do jakýchkoliv residuálních nádorových buněk v místě chirurgického zákroku, což indukuje jejich apoptosu (programovanou smrt buněk). Tato léčba ovlivní dlouhodobé přežívání pacienta a/nebo redukuje množství normální tkáně v sousedství nádoru, která musí být chirurgicky odstraněna.

Tumor-supresorové činidlo je výhodně obsaženo v prostředku pro lokální podání, jak jsou v oboru známy. Například, infekční přípravek lidského p53 tumor-supresorového genu (například A/C/N/53) se suspenduje ve vhodném vehikulu (jako je například žlutá vazelina nebo jiný krém nebo mast), které je vhodné pro aplikaci do místa chirurgického zákroku. Alternativně může být tumor-supresorové činidlo připraveno v aerosolovém prostředku pro aplikaci ve formě spreje do místa zákroku. V jiném provedení může být tumor-supresorové činidlo připraveno jako degradovatelný (resorbovatelný) materiál, například jako resorbovatelný porézní materiál, který může být vložen do tělesné dutiny a který může uvolňovat tumor-supresorový protein nebo vektor po určité době.

Výhodná provedení pro aplikace rekombinantních adenovirových vektorů do určitých definovaných oblastí, například na rohovku, do gastrointestinálního traktu, do resekčních míst nádorů využívají pevných nosičů pro dosažení dlouhodobé inkubační doby a pro usnadnění virové infekce. Nosiče mohou být gázy nebo

masti namočené do roztoku rekombinantního adenoviru. Virus může být aplikován pomocí gázy na rohovku pro dosažení zlepšené účinnosti transgenu. Drenovaná gáza může být také profylakticky aplikována do resekční plochy po tumoru, aby se předešlo recidivě. Masti mohou být aplikovány lokálně do oblastí gastrointestinálního traktu, nebo lokálně na slinivku břišní, za účelem terapie tumor-supresorovým genem.

Příkladné mastové nosiče zahrnují Puralube® založený na bazi žluté vazeliny nebo ve vodě rozpustný KJ-Jelly®. V příkladu techniky je sterilní gázový tampon (5 x 5 cm) nebo testovací proužek pro testování tvorby slz namočen do roztoku adenovirového vektoru (například 1×10^9 PN/ml), takže je zcela vlhký. Tampony nebo proužky jsou položeny na povrch cílové tkáně a jsou inkubovány při 37 °C po dobu 30 minut. Odborníkům v oboru bude jasné, že mohou být použity jiné tkaniny, želatiny nebo masti, které mohou být vychytávány nebo které jsou mísitelné s vodou. Kromě toho mohou být přidána další činidla, která zvyšují přenos, jak jsou popsána výše.

VI. Kombinovaná léčba s jinými chemoterapeutickými činidly

A. Tumor-supresorové činidlo podané v kombinaci s kombinovanými chemoterapeutickými režimy

Mělo by být jasné, že způsoby podle předkládaného vynálezu nejsou omezeny na kombinaci tumor-supresorového činidla s jedním adjuvantním protinádorovým činidlem. Ačkoliv obsahují způsoby podle předkládaného vynálezu obvykle kontaktování buněk s tumor-supresorovým činidlem (například p53) a adjuvantním protinádorovým činidlem jako je paclitaxel, zahrnují také způsoby podle předkládaného vynálezu také kontaktování buněk s tumor-supresorovým genem nebo polypeptidem a dvěma, třemi nebo

více adjuvantními protinádorovými činidly a volitelně s dalšími chemotereapeutickými činidly. Kromě toho, je jasné, že chemoterapeutické činidlo může být také použito s tumor-supresorovými proteiny nebo geny, za absence adjuvantního protinádorového činidla.

Množství chemoterapeutických léků je známo v odborné a patentové literatuře; příklady léků, které mohou být použity ve způsobech podle předkládaného vynálezu, jsou: činidla způsobující poškození DNA (včetně alkylačních činidel), jako je např. cisplatina, karboplatina (viz např. Duffull (1997) Clin. Pharmacokinet. 33: 161-183); Droz (1996) Ann. Oncol. 7: 997-1003), navelbin (vinorelbin), Asaley, AZQ, BCNU, busulfan, karboxyftalatoplatina, CBDCA, CCNU, CHIP, chlorambucil, chlorotozocin, cis-platina, clomeson, kyanmorfolino-doxorubicin, cyklodison, cytoxan, dianhydrogalaktitol, fluorodopan, hepsulfam, hycanthon, melfalan, methylCCNU, mitomycin C, mitozolamid, nitrogen mustard, PCNU, piperazin alkylator, piperazindion, pipobroman, porfiromycin, spirohydantoin mustard, teroxiron, tetraplatin, thio-tepa, triethylenmelamin, uracil nitrogen mustard, Yoshi-864); inhibitory topoisomerasy I (například topotekan hydrochlorid, irinotekan hydrochlorid (CPT-11), camptothecin, Na sůl camptothecinu, aminocamptothecin, CPT-11 a další deriváty camptothecinu); inhibitory topoisomerasy II (doxorubicin, včetně doxorubicinu v liposomech (viz U.S. patenty č. 5013556 a 5213804), amonafid, m-AMSA, anthrapyrazolové deriváty, pyrazoloakridin, bisanthren Hcl, daunorubicin, deoxydoxorubicin, mitoxantron, menogaril, N,N-dibenzyl daunomycin, oxathrazol, rubidazon, VM-26 a VP-16); antimetabolity RNA/DNA (například L-alanosin, 5-azacytidin, 5-fluorouracil, acivicin, aminopterín, deriváty aminopterinu, antifol, Bakerův solubilní antifol, dichlorallyl lawson,

brequinar, ftorafur (proléčivo), 5,6-dihydro-5-azacytidin, methotrexat, deriváty methotrexatu, N-(fosfonoacetyl)-L-aspartat (PALA), pyrazofurin a trimetrexat); a antimetabolity DNA (například 3HP, 2'-deoxy-5-fluoruridin, 5-HP, alfa-TGDR, aphidicolin glycinat, ara-C, 5-aza-2'-deoxycytidin, beta-TGDR, cyklocytidin, guanazol, hydroxymočovina, inosin, glykodialdehyd, macbecin II, pyrazolimidazol, thiguanin a thiopurin). Tumor-supresorová nukleová kyselina a/nebo polypeptid mohou být také podány v kombinaci s chemoterapeutickými činidly jako je vinkristin, temozolomid (viz například U.S. patent č. 5260291) a toremifen (viz například U.S. patent 4696949 pro informace o toremifenu).

Preklinické studie provedené na relevantních zvířecích modelech ukázaly, že p53 adenovirus kombinovaný s cisplatinou, karboplatinou, navelbinem, doxorubicinem, 5-fluoruracilem, methotrexatem nebo etoposidem inhibuje proliferaci účinněji než chemoterapie samotná při léčbě nádorových buněčných linií: SSC-9 hlavy a krku, SSC-15 hlavy a krku, SK-OV-3 ovaria, DU-145 prostaty, MDA-MB-468 prsu a MDA-MB-231 prsu. V jiném provedení je zvýšená protinádorová účinnost pozorována při použití trojkombinace obsahující p53 gen (exprimovaný například v adenovirovém vektoru), adjuvantní protinádorové činidlo (například paclitaxel) a činidlo způsobující poškození DNA (například cisplatinu). Byla prokázána účinnost kombinace p53, paclitaxelu a cisplatinu v modelu ovariálního karcinomu. Tato data podporují použití genové terapie genem p53 v kombinaci s chemoterapií v klinických pokusech.

Tyto další chemoterapeutické léky mohou být použity v kombinaci s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou a/nebo polypeptidem s nebo bez adjuvantního protinádorového činidla. Vynález také předpokládá použití aktinoterapie v kombinaci s

jedním nebo více zde popsanými tumor-supresorovými činidly nebo v kombinaci s tumor-supresorovým činidlem a adjuvantním protinádorovým činidlem.

Také se předpokládá, že jakékoliv z těchto chemoterapeutických činidel může být použito jednotlivě v kombinaci s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou nebo polypeptidem podle předkládaného vynálezu.

Pokud je tumor-supresorová nukleová kyselina (například p53) podaná v adenovirovém vektoru s adjuvantním protinádorovým činidlem (například paclitaxelem) a činidlo způsobujícím poškození DNA (například cisplatinou, karboplatinou nebo navelbinem), tak je adenovirový vektor obvykle podáván po dobu 5 až 14 dnů v dávce $7,5 \times 10^{12}$ až $7,5 \times 10^{13}$ adenovirových částic na den. Například může být použita denní dávka přibližně $7,5 \times 10^{13}$ adenovirových částic v kombinaci s karboplatinou. V jednom provedení je denní dávka přibližně $7,5 \times 10^{12}$ adenovirových částic použita pro podání do plic. V jiném provedení je p53 podán v kombinaci s topotecanem.

Obvykle je činidlo způsobující poškození DNA podáno v doporučené dávce, viz například Physician's Desk Reference, 51. vydání (Medical Economics, Montvale, NJ, 1997). Například karboplatina je podána v takové dávce, aby bylo dosaženo AUC (plochy pod křivkou) přibližně 6 - 7,5 mg/ml/min.

Inhibitory proteas

V ještě jiném provedení obsahuje předkládaný vynález kombinované použití tumor-supresorové nukleové kyseliny a/nebo polypeptidu a inhibitoru proteasy. Mezi výhodné inhibitory proteasy patří - bez omezení - inhibitory kolagenasy,

inhibitory matrixových metaloproteinaz (MMP) (viz například Chambers (1997) J. Natl. Cancer Inst. 86: 1260-1270). Ve výhodném provedení obsahuje způsob podle předkládaného vynálezu současné nebo sekvenční podání účinného množství inhibitoru proteasy a účinného množství tumor-supresorového polypeptidu a/nebo nukleové kyseliny. Příklady sloučenin, které jsou inhibitory proteas, jsou dobře známé v odborné a v patentové literatuře.

Imunomodulátory

Tumor-supresorové proteiny a nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu mohou být použity spolu s imunomodulátory, které buď zvyšují imunitní odpověď namířenou proti hyperproliferativním nebo nádorovým buňkám (například imunitní odpověď namířenou proti nádorově specifickým antigenům), nebo snižují imunitní odpověď namířenou proti tumor-supresorovému proteinu, tumor-supresorové nukleové kyselině, tumor-supresorovému vektoru (například anti-adenovirovou reakci) a/nebo kombinovaným chemoterapeutickým činidlům. Například, způsob podle předkládaného vynálezu obsahuje kombinované současné nebo sekvenční podání účinného množství tumor-supresorového polypeptidu a/nebo nukleové kyseliny a účinného množství imunomodulátoru. Mezi imunomodulátory patří, bez omezení, cytokiny jako je IL-2, IL-4, IL-10 (U.S. 5231012; Lalani (1997) Ann. Allergy Asthma Immunol. 79: 469 - 483; Geissler (1996) Curr. Opin. Hematol. 3: 203-208)), IL-12 (viz například Branson (1996) Human Gene Ther. 1: 1995-2002) a interferon- γ .

Imunomodulátory, které působí jako imunosupresiva, mohou být použity pro zmírnění imunitní odpovědi namířené proti terapeutickému činidlu (tumor-supresorovému proteinu nebo

nukleové kyselině nebo adjuvantními protinádorovému činidlu, atd.). Imunosupresiva jsou v oboru dobře známá. Mezi výhodná imunosupresiva patří například cyklophosphamid, dexamethason, cyklosporin, FK506 (tacrolimus) (Lochmuller (1996) Gene Therapy 3: 706-716)), IL-10 a podobně. Také mohou být použity protilátky proti povrchovým buněčným receptorům. Pro tento účel mohou být použity například protilátky, které blokují vazbu ligandu na receptory B buněk, T buněk, NK buněk makrofágů a nádorových buněk. Pro příklady této strategie viz například Yang (1996) Gene Therapy 3: 412-420; Lei (1996) Human Gene Therapy 7: 2273-2279; Yang (1996) Science 275: 1862-1867.

VII. Terapeutické kity

V jiném provedení vynález obsahuje terapeutické kity. Kity obsahují tumor-supresorovou nukleovou kyselinu nebo polypeptid nebo farmaceutický prostředek obsahující tumor-supresorovou nukleovou kyselinu nebo polypeptid. Kity mohou také obsahovat adjuvantní protinádorové činidlo nebo farmaceutický prostředek. Různé prostředky mohou být obsaženy v oddělených zásobnících pro separované podání nebo pro smísení před podáním. Alternativně mohou být různé prostředky obsaženy v jednom zásobníku. Kity mohou také obsahovat různé prostředky, pufrы, testovací činidla a podobně, které jsou vhodné pro provedení způsobů podle předkládaného vynálezu. Kromě toho mohou kity obsahovat instrukce pro použití kitu v různých způsobech podle předkládaného vynálezu (například při léčbě nádorů, při profylaxi a/nebo léčbě metastas a podobně).

Kit může volitelně obsahovat jeden nebo více imunomodulátorů (například imunosupresiv). Zejména výhodnými imunomodulátory jsou imunomodulátory, které zde byly popsány.

VIII. Buňky obsahující heterologní tumor-supresorové nukleové kyseliny nebo polypeptidy a jiná činidla

Dále obsahuje předkládaný vynález transfektované nebo jinak zpracované eukaryotické nebo prokaryotické hostitelské buňky (například savčí buňky) obsahující heterologní tumor-supresorovou nukleovou kyselinu a/nebo tumor-supresorový polypeptid. Buňky mohou dále obsahovat adjuvantní protinádorové činidlo, například paclitaxel, nebo jiné činidlo ovlivňující činnost mikrotubulů.

Mezi vhodné prokaryotické buňky patří například bakteriální buňky jako jsou buňky *E. coli*. Mezi vhodné živočišné buňky patří například jakékoliv savčí buňky, lépe jakékoliv neoplastické nebo nádorové buňky, jako jsou buňky, které jsou zde popsány.

Transfektované hostitelské buňky podle předkládaného vynálezu jsou použitelné jako prostředky pro diagnostiku nebo terapii. Při farmaceutickém použití mohou být kombinovány s farmaceuticky přijatelnými nosiči jak jsou popsány výše pro genovou terapii ex vivo. Buňky mohou být podány profylakticky nebo terapeuticky v účinných množstvích, jak byla podrobně popsána výše. V diagnostice mohou být buňky použity pro výukové nebo jiné referenční účely a jsou vhodným modelem pro identifikaci takto transfektovaných a/nebo ošetřených buněk.

IX. Preklinická a klinická účinnost genové terapie p53 adenovirem

V několika zemích v současnosti probíhá fáze I/II klinických studií adenovirem zprostředkované p53 genové terapie. Farmaceutické prostředky použité v těchto klinických studiích

jsou například adenovirus exprimující přirozený p53 podle předkládaného vynálezu (rAd/p53), který se skládá z replikace-defektního, adenovirové (typ 5) vektoru exprimujícího lidský tumor-supresorový gen pod kontrolou cytomegalovirového promotoru ("rAd5/p53"), jak je zde popsán (viz Wills (1994), výše).

Regionální podání

Karcinom ovaria omezený na dutinu břišní je jednou klinickou situací, ve které je výhodnou léčbou regionální terapie p53 genem, t.j. intraperitoneální aplikace.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady ilustrují, ale neomezují předkládaný vynález.

Příklad 1: Kombinovaná terapie p53 a Taxolem®

Vynález obsahuje kombinované podání nukleové kyseliny exprimující tumor-supresorový polypeptid a paclitaxelu pro léčbu neoplastických onemocnění. Následující příklad podrobně popisuje schopnost adenoviru exprimujícího p53 podle předkládaného vynálezu v kombinaci s Taxolem® léčit nádory a uvádí, že kombinovaná terapie je účinnější v usmrcení nádorových buněk než terapie každým činidlem samostatně.

Kombinovaná terapie in vitro

Buňky byly podrobeny jednomu ze tří léčebných režimů: v léčbě 1 byly buňky nejprve předšetřeny Taxolem® 24 hodin před expozicí p53 adenovirovému konstruktu A/C/N/53; v léčbě 2 byly

buňky předem ošetřeny p53 adenovirovým konstruktem a později byly vystaveny taxolu®; v léčbě 3 byly buňky vystaveny zároveň působení Taxolu® a p53 adenoviru. p53 Ad a Taxol® mohou tedy být podány ve stejné 24-hodinové periodě.

Přibližně $1,5 \times 10^4$ buněk v kultivačním mediu (buněčné linie nádorů hlavy a krku SCC-9, SCC-15, a SCC-29 v 1:1 směsi DMEM + Ham's F12 media s 0,4 $\mu\text{g/ml}$ kortisolu a 10% FBS a 1% neesenciálních aminokyselin; prostatická buněčná linie Du-145 a ovariální buněčná linie SK-OV-3 v Eaglově esenciálním mediu s 10% FBS) se přidá do každé jamky 96-jamkové mikrotitrační plotny a provede se kultivace po dobu přibližně 4 hodin při 37 °C a 5% CO₂. Do každé jamky se přidá lék (Taxol®), p53 adenovirus nebo vhodné vehikulu/pufr. Protože paclitaxel není rozpustný ve vodě, rozpustí se lék před aplikací v alkoholu. Buňky se potom kultivují přes noc při 37 °C a v 5% CO₂. p53 adenovirus se aplikuje ve fosfatovém pufru (20 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 130 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2% sacharosa).

Smrt buněk se kvantifikuje za použití techniky, kterou popsal Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65: 55-63. Stručně, 25 μl 5 mg/ml MTT vital barviva [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylyltetrazoliumbromid] se přidá do každé jamky a provede se inkubace po dobu 3-4 hodin při 37 °C a v 5% CO₂. Potom se do každé jamky přidá 100 μl 10% SDS detergentu a provede se inkubace přes noc při 37 °C a v 5% CO₂. Signál v každé jamce je kvantifikován za použití čtečky mikroploten (Thermo-Max, Molecular devices). Použité buněčné linie a získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: In vitro hodnocení adjuvantního protinádorového činidla (Taxol®) v kombinaci s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou

Léčba

Buněčná linie nádor	Dávka Taxolu® (µg/ml)	Dávka A/C/N/53 (m.o.i.)	Před-léčení Taxolem®	Před-léčení p53	Současné podání
SK-OV-3 Karcinom ovaria	0,37	40	aditivní efekt $p \leq 0,0001$	bez efektu $p > 0,2000$	aditivní efekt $p \leq 0,0001$
SCC-25 Karcinom hlavy a krku	0,10 nebo 0,01	2,5 nebo 5,0	aditivní efekt $p \leq 0,0001$	velmi malý efekt $p = 0,0606$	aditivní efekt $p \leq 0,0001$
SCC-15 Karcinom hlavy a krku	0,10 nebo 0,01	2,5 nebo 5,0	aditivní efekt $p \leq 0,002$	aditivní efekt $p \leq 0,0001$	aditivní efekt $p \leq 0,0001$
Du-145 Karcinom prostaty	0,36 nebo 0,036 nebo 0,0036	2,5 nebo 5,0	aditivní efekt $p \leq 0,03$	aditivní efekt $p \leq 0,0001$	aditivní efekt $p \leq 0,0001$
SCC-9 Karcinom hlavy a krku	0,12 nebo 0,012 nebo 0,0012	2,5 nebo 5,0	aditivní efekt $p \leq 0,01$	aditivní efekt $p \leq 0,0001$	aditivní efekt $p \leq 0,0001$

Obecně je p53 adenovirus účinnější, když je podán po nebo současně s Taxolem®, než když je před Taxolem®. Tyto výsledky ukazují na synergismus mezi A/C/N/53 a Taxolem®.

Isobologramová analýza určující synergistický účinek

SK-OV-3 (p53-nulová varianta) ovariálních nádorových buněk je ošetřena kombinacemi Taxolu® a p53/adenovirem (A/C/N/53), jak je uvedeno v tabulce 2. Dávkování bylo stejné, jak je uvedeno výše. Smrt buněk byla kvantifikována v den 3 za použití MTT testu, jak je popsán výše. Kromě toho byly vytvořeny křivka dávka-odpověď pro p53 Ad samotný (za použití dávek uvedených v tabulce 2) (po 2 dnech expozice buněk léku) a křivka dávka-odpověď pro Taxol® samotný za použití dávek uvedených výše (po 3 dnech expozice buněk léku).

Tabulka 2: Léčebné skupiny pro kombinovaná ošetření Taxolem® a p53 Ad (A/C/N/53)

Skupina	Taxol® (µg/ml)	p53 Ad (m.o.i.)	Skupina	Taxol® (µg/ml)	p53 Ad (m.o.i.)
1	0,001	0,5	25	0,001	10
2	0,01	0,5	26	0,01	10
3	0,1	0,5	27	0,1	10
4	0,5	0,5	28	0,5	10
5	1	0,5	29	1	10
6	5	0,5	30	5	10
7	10	0,5	31	10	10
8	20	0,5	32	20	10
9	0,001	1	33	0,001	25
10	0,01	1	34	0,01	25
11	0,1	1	35	0,1	25
12	0,5	1	36	0,5	25

13	1	1	37	1	25
14	5	1	38	5	25
15	10	1	39	10	25
16	20	1	40	20	25
17	0,001	5	41	0,001	50
18	0,01	5	42	0,01	50
19	0,1	5	43	0,1	50
20	0,5	5	44	0,5	50
21	1	5	45	1	50
22	5	5	46	5	50
23	10	5	47	10	50
24	20	5	48	20	50

Obr. 1 ilustruje inhibici proliferace buněk (ve srovnání s kontrolními buňkami ošetřenými puforem) v závislosti na typu ošetření. Obecně, stoupající dávky buď Taxolu®, nebo p53 snižují rychlost proliferace buněk, kdy kombinace p53 a Taxolu® má vyšší účinnost než každé léčivo samostatně.

Obr. 2 ilustruje isobologramovou analýzu těchto dat za použití Isobole metody, která je popsána v Berenbaum (1989) Pharmacol. Rev. 93-141. Synergismus mezi Taxolem® a p53 (A/C/N/53) byl pozorován tehdy, když byly buňky předem ošetřeny Taxolem® 24 hodin před expozicí p53 (A/C/N/53). Na obr. 2 představuje přímka (isobola pro ED₃₀) vliv na proliferaci buněk, který by byl očekáván, pokud by účinek dvou léků byl pouze aditivní. Ve skutečnosti jsou pozorované účinky více vlevo od předpokládané přímky, což ukazuje, že byly nutné nižší než předpokládané koncentrace pro každé léčivo a že došlo k synergismu mezi těmito dvěma léčivy.

Příklad 2: Genová terapie zprostředkovaná p53-adenovirem při léčbě metastas

Vynález obsahuje způsob pro podání nukleové kyseliny exprivující tumor-supresorový polypeptid při léčbě metastas. Následující příklad podrobně popisuje schopnost p53 exprivujícího adenoviru podle předkládaného vynálezu infikovat různé tkáně v těle a léčit metastasy.

Samicím SCID myši (myši homozygotních pro SCID mutaci, kterých chybí jak B, tak T buňky z důvodů V(D)J rekombinace) byly podány do tukové vrstvy v oblasti prsní žlázy buňky karcinomu prsu MDA-MB-231 v dávce 5×10^6 . Po uchycení primárních nádorů a po jejich metastasování do plic byly primární nádory chirurgicky odstraněny (v den 11). Myši byly léčeny intravenosním podáním A/C/N/53 nebo kontrolního pufru v den 23, 30, 37, 44 (1qW), kdy A/C/N/53 (p53 v adenoviru) byl podán v dávce 4×10^8 C.I.U./injekci. V den 49 byly plíce odebrány, fixovány, barveny a mikroskopicky vyšetřovány.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Inhibice plicních metastas MDA-MB-231 za použití A/C/N/53.

Léčba	Počet metastas	≤ 6 metastas	≥ 84 metastas
Pufr n = 17	11 (65%)	1 (6%)	5 (29%)
A/C/N/53 n = 10	5 (50%)	4 (40%)	1 (10%)

Léčba A/C/N/53 snižuje počet metastas u myši s prokázanými metastasami.

Ve druhém pokusu byly do 231 tumorů v tukové tkáni prsních žlaz SCID nebo SCID-beige myši podány peritumorální injekce

A/C/N/53. Celková dávka $2-4 \times 10^9$ C.I.U. podaná v 10 injekcích snížila počet myší s plicními metastasami o 80% u SCID myší a o 60% u SCID-beige myší. Také počet metastas na myš se výrazně snížil u myší s jakýmkoliv plicními nádory. Jak je uvedeno výše, intravenosní podání A/C/N/53 je také účinné při léčbě plicních metastas u SCID myší. Tato data ukazují, že protinádorová genová terapie A/C/N/53 může ovlivňovat kromě růstu primárního nádoru také závažnost metastatického onemocnění.

V jiném pokusu bylo samicím SCID myší podáno 5×10^6 MDA-MB-231 buněk nádoru prsu/myš do tukové tkáně prsní žlázy v den 0. Primární (prsní) nádory byly chirurgicky odstraněny v den 18. Myši byly léčeny intravenosní injekcí pufru, β -gal Ad, nebo p53 Ad (A/C/N/53) ve dny 21, 24, 32, 39 a 36. Dávka viru na injekci byla 4×10^8 C.I.U (A/C/N/53) (PN/C.I.U = 23,3) a $9,3 \times 10^9$ částic β -gal Ad (PN/C.I.U. = 55,6; $1,7 \times 10^8$ C.I.U.).

Plíce a játra byly odebrány v den 51 a byly fixovány ve formalinu. Tkáňové řezy byly vyšetřovány na přítomnost plicních nádorů a na poškození jater. Hlavní orgány od 2 myší ošetřených pufrem a od 2 myší ošetřených β -gal Ad byly zmrazeny pro prokrájení za zmrazeného stavu a analýzu β -galaktosidasové enzymatické aktivity.

Tabulka 4: Inhibice plicních metastas MDA-MB-231 za použití A/C/N/53

Plicní metastasy na myš	Pufr *	β -gal Ad *	p53 Ad
≤ 20	11% (1)	8% (1)	21% (3)
> 20 a ≤ 100	11% (1)	33% (4)	79% (11)
> 100 a ≤ 200	33% (3)	33% (4)	0% (0)

> 200 a ≤ 300	33% (3)	17% (2)	0% (0)
> 300	11% (1)	8% (1)	0% (0)
Celkový hodnocený počet	9	12	14
Opětovný růst primárního nádoru	82% (9/11)	88% (14/16)	100% (14/14)

* Počet metastas je podhodnocen. V plicích rostly vícečetné nádory.

Počet metastas na plíci ve skupině léčené pufrem a β -gal Ad nebyl signifikantně odlišný ($p = 0,268$, viz tabulka 4).

Léčba p53 Ad významně redukuje počet metastas na plíci ve srovnání s léčbou pufrem I β -Ad ($p < 0,001$ a $p < 0,002$, v příslušném pořadí). Kromě redukce počtu metastas byla také pozorována výrazná redukce velikosti plicních metastas ve skupině léčené p53 Ad. V kontrolních skupinách byly tkáňové řezy z většiny plic z více než 50% tvořeny nádorovou tkání a jednotlivé metastasy již nebylo možno v plicích rozeznat. Oproti tomu, plicní metastasy u většiny případů ze skupiny léčené p53 Ad byly malé a snadno rozlišitelné jako jednotlivé nádory.

Tkáňová distribuce adenoviru

V jaterní tkáni byl detekován velký počet infikovaných buněk (přibližně 50%) a aktivita β -galaktosidasy byla silná. V plicích byly rozptýlené plochy infikovaných buněk rovnoměrně distribuovány ve tkáni. Ve střevu a v žaludku byla pozorována periodická infekce buněk v zevní stěně hladkého svaly okolo orgánů. Byla také detekována aktivita β -galaktosidasy v rozptýlených mikrokalcích v lumen. Zevní vrstva hladkého svaly dělohy vykazovala podobný periodický charakter infekce jako byl

pozorován ve střevu. Většina buněk stromatu vaječníků byla infikována. Ve slezině byla detekována rozptýlená aktivita β -galaktosidasy ve složce hladkého svalu orgánu. Velmi málo infikovaných buněk (< 1%) bylo detekováno v příčně pruhovaném srdečním svalu. Téměř nebyly detekovány infikované buňky v tukové vrstvě prsních žlaz, ani v příčně pruhovaném svalu pod prsní žlázou. Žádné infikované buňky nebyly detekovány v ledvinách.

Jaterní patologie

Všechny játra byly při pitvě vizuálně normálního vzhledu. NV žádných játrech nebyla detekována přítomnost nadměrných nekros. Nicméně, u myši léčených adenovirem byly detekovány abnormality hepatocytů (které nebyly přítomné u skupiny léčené pufrem), které zahrnovaly vyšší počet buněk v mitose, buněčné inkluse a změny velikosti a tvaru hepatocytů.

Příklad 3: Genová terapie p53 adenovirem při léčbě xenotransplantátů lidského karcinomu prsu

Vynález obsahuje způsoby pro léčbu různých nádorů, které obsahují podání nukleové kyseliny exprivující tumor-supresorový polypeptid. Následující příklad popisuje schopnost adenoviru exprivujícího p53 podle předkládaného vynálezu léčit lidský karcinom prsu.

Vložení přirozeného p53 do nádorů bez p53 nebo s mutantním p53 je novou strategií pro kontrolu nádorového růstu. Casey (1991) Oncogene 6: 1791-1797, vložil přirozený p53 do buněk karcinomu prsu in vitro pomocí plasmidového DNA vektoru. Počet rostoucích kolonií MDA-MB-468 (p53^{mut}) a T47D (p53^{mut}) se po plasmidové transfekci snížil o 50%. Žádná z výsledných kolonií

také neexprimovala přirozený p53. Oproti tomu, počet kolonií MCF-7 (přirozený p53) nebyl ovlivněn. Negrini (1994) Cancer Res. 54: 1818-1824, provedl podobnou studii za použití MDA-MB-231 buněk. Tvorba kolonií se po transfekci plasmidem obsahujícím přirozený p53 snížila o 50% a žádná z výsledných kolonií neexprimovala přirozený p53. Paradoxně byly v této studii podobné výsledky pozorovány pro MCF-7 buňky.

Ve studii popsané v tomto příkladu byla účinnost replikace defektního, rekombinantního p53 adenoviru s deletovaným E1 regionem (p53 Ad; (A/C/N/53) Wills (1994), výše) testována na nádorových liniích lidského karcinomu prsu exprimujících mutantní p53 MDA-MB-231, MDA-MB-468 a MDA-MB-435. Buňky MDA-MB-231 obsahují mutaci Arg na Lys v kodonu 280 genu pro p53 (Bartek (1990) Oncogene 5: 893-899). MDA-MB-468 obsahují mutaci Arg na His v kodonu 273 (Id.). MDA-MB-435 buňky obsahují mutaci Gly na Glu v kodonu 266 genu pro p53 (Lesoon-Wood (1995) Hum. Gene Ther. 6: 395-405).

Dřívější studie prokázaly vysoké hladiny exprese přirozeného p53 v nádorových buňkách odvozených z nádorů prsu, ovaria, plic, kolorekta, jater, mozku a močového měchýře po infekci p53 Ad in vitro (Wills (1994), výše; Harris et al., (1996) Cancer Gene Therapy 3: 121-130). Adenovirem zprostředkovaná exprese p53 nakonec vede ke změnám v morfologii buněk a k indukci apoptosy u nádorových buněk bez p53 nebo buněk s mutantním p53. Infekce buněk karcinomu prsu 468 p53 Ad v dávce 10 m.o.i. (opakovaná infekce) způsobuje téměř 100% inhibici syntézy DNA za 72 hodin po infekci. Kromě toho, infekce p53 Ad in vitro také inhibuje proliferaci MDA-MB-468 a MDA-MB-231 buněk s hodnotami ED_{50} 3 ± 2 , resp. 12 ± 10 m.o.i. Proliferace tří dalších nádorových linií karcinomu prsu s mutací p53 byla také inhibována při nízkých koncentracích p53 Ad.

Hodnoty ED_{50} byly 16 ± 4 m.o.i. pro SK-BR-3 buňky, 3 ± 3 m.o.i. pro T-47D buňky a 2 ± 2 m.o.i. pro BT-549 buňky. Infekce MDA-MB-468 a MDA-MB-231 buněk dávkou 30 m.o.i. ekvivalentního, rekombinantního adenoviru exprimujícího β -galaktosidasu *E. coli* (β -gal), místo p53, vedla ke vzniku $> 67\%$ β -gal pozitivních MDA-MB-468 buněk a 33-66% β -gal pozitivních MDA-MB-231 buněk. Při korelaci procenta β -gal pozitivních buněk s antiproliferativním účinkem p53 na velkém panelu nádorových buněk Harris et al. (výše) prokázali silnou pozitivní korelaci mezi stupněm inhibice indukované p53 a stupněm přenosu adenoviru. Naopak, buněčné linie exprimující normální hladiny přirozeného p53 byly minimálně ovlivněny přenosem p53, bez závislosti na rychlosti přenosu adenoviru.

Proliferace MCF7 a HBL-100 buněk, dvou buněčných linií lidského karcinomu prsu, které obsahují přirozený p53, byla in vitro relativně neovlivněna p53 Ad v koncentracích vyšších nebo rovných 99 m.o.i. Jinými slovy, inhibice růstu MCF-7 a HBL-100 buněk vyžaduje koncentrace p53 Ad alespoň 8-, resp. 33-krát vyšší, než jsou hodnoty ED_{50} pro MDA-MB-231, resp. MDA-MB-468 buňky. Při použití podobného rekombinantního p53 Ad prokázal Katayose, (1995) Clin. Cancer Res. 1: 889-897, vyšší expresi p53 proteinu, nižší proliferaci buněk a vyšší stupeň apoptosy u MDA-MB-231 buněk transformovaných in vitro. Tato studie rozšiřuje in vitro výsledky pro MDA-MB-468 a MDA-MB-231 buňky na xenotransplantáty karcinomu prsu in vivo. Účinnost genové terapie p53 adenovirem je hodnocena na jiné buněčné linii karcinomu prsu (MDA-MB-435), která je resistentní na transformaci adenovirem in vitro.

Materiál a metody

Buněčné linie a adenovirová infekce in vitro

Buněčné linie lidského karcinomu prsu MDA-MB-231, -468 a -435 byly získány od ATCC (Rockville, Maryland, USA). MDA-MB-231 byly kultivovány v DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY) s 10% fetálním telecím sérem (FCS; Hyclone, Logan, Utah) při 37 °C a v 5% CO₂. MDA-MB-468 buňky byly kultivovány v Leibovitzově L-15 mediu (Life Technologies) obsahujícím 10% FCS při 37 °C. MDA-MB-435 buňky byly kultivovány v Leibovitzově L-15 mediu obsahujícím 15% FCS a 10 µg/ml hovězího inzulinu (Sigma Chem. CO., St. Louis, Missouri) při 37 °C.

Konstrukce a propagace rekombinantních adenovirů (rAd) exprimujících lidský přirozený p53 a β-galaktosidasu E. coli, ve kterých je exprese transgenů řízena lidským cytomegalovirovým promotorem, byla popsána dříve (Wills (1994), výše). Adenoviry byly podány ve fosfatovém pufru (20 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 130 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2% sacharosa). C.I.U. označuje buněčné infekční jednotky. Koncentrace infekčních virových částic byla stanovena měřením 293 buněk pozitivních na virový hexonový protein 48 po infekci (Huyghe (1995) výše).

Pro in vitro studie infekce p53 Ad byly buňky umístěny v hustotě 1 až 5 x 10⁴ buněk/jamku ve 12-jamkových tkáňových kultivačních plotnách (Becton Dickinson, Lincoln Park, New Jersey, USA). Buňky byly transformovány 0, 10 nebo 50 m.o.i. (množství infekce = C.I.U./buňku) p53 Ad a byly kultivovány po dobu 72 hodin, jak bylo popsáno dříve (Wills (1994, výše). Pro in vitro studie infekce βgal Ad byly buňky umístěny v hustotě 1 x 10⁵ buněk/jamku. Buňky byly transformovány 0, 10, 50 nebo 100 m.o.i. β-gal Ad. Po 48 hodinách byly buňky fixovány 0,2% glutaraldehydem (Sigma Chemical Co.) a potom byly 3-krát promyty PBS (Life Technologies). Buňky byly potom testovány v 1 ml X-Gal roztoku (1,3 mM MgCl₂, 15 mM NaCl, 44 mM Hepes pufru,

pH 7,4, 3 mM ferrikyanidu draselného a 1 mg/ml X-Gal v N,N-dimethylformamidu (10% konečná koncentrace)). X-Gal byla získána od Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, Indiana. Všechny ostatní chemikálie byly získány od Sigma.

Pro určení procenta transformovaných buněk bylo z každé kultivační jamky prohlíženo 5 mikroskopických polí a pro 3 jamky při každé m.o.i. bylo vypočítáno průměrné procento buněk exprimujících β -gal.

Léčba adenovirem in vivo

Athymické samice holých myší byly získány od Charles River Laboratories (Wilmington, Massachusetts, USA). Všechny myši byly chovány ve VAF-barrier boxech a všechny pokusy na zvířatech byly provedeny podle pravidel uvedených v N.I.H. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Nádorové buňky byly injekčně podány buď podkožně, nebo do tukové vrstvy prsních žláz.

Inokulační dávky buněk byly: 5×10^6 buněk MDA-MB-231/myš; 1×10^7 buněk MDA-MB-468/myš a 1×10^7 MDA-MB-435 buněk/myš. Nádory se nechaly růst in vivo po dobu 10 až 11 dní před podáním první dávky, s výjimkou pokusu s buňkami MDA-MB-468, ve kterých rostly nádory po dobu 33 dní před zahájením léčby. Objem nádorů byl stanoven měřením ve třech rozměrech. Objemy nádorů pro každou skupinu každý den byly srovnávány za použití Student testu pomocí Statview II softwaru (Abacus Concepts, Berkeley, California). Průměrná procenta inhibice pro skupiny s podanou dávkou ve dny 0 až 4 a 7 až 11 byla vypočítána za použití hodnot statistické významnosti ($p < 0,05$) pro dny od 14. až do konce studie.

Specifické účinky p53 byly odlišeny od účinků adenovirového vektoru odečtením průměrné inhibice růstu způsobené β -gal Ad od inhibice růstu způsobené p53 Ad. Všechny injekce viru byly peri/intranádorové. Obecně byly každé myši podány dvě 5 denní serie protinádorové terapie (t.j. 5 injekcí), které byly odděleny 2 denní "odpočinkovou periodou". V některých případech bylo podávání dávky prodlouženo na více než 2 týdny a/nebo byl místo některých injekcí viru podán pufr. Křivky růstu nádoru uvádějí průměrný objem nádoru $\pm$ SEM.

Histologické a Apoptag imunohistochemické vyšetření

Vzorky tkáně byly fixovány v 10% pufovaném formalinu, byly zpracovány přes noc v Miles VIP Tissue Processor a potom byly ponořeny do parafinu. Tkáňové řezy o síle 5 mikronů byly vyrobeny za použití Leitzova mikrotomu. Řezy byly barveny běžným Harrisovým hematoxylinem a eosinem (Luna et al. (1968), Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, New York, McGraw Hill Book Co.).

Apoptag in situ kity pro detekci apoptosy byly získány od Oncor (Gaithersburg, Maryland, USA). Vzorky byly analyzovány podle návodu pro použití kitu. Stručně, deparafinované, rehydratované tkáňové řezy byly zpracovány s Oncor Protein Digesting Enzyme, byly inkubovány s TdT a byly vyvíjeny za použití avidin-peroxidasového kitu (králičí IgG - Sigma Chem. Co. č. Extra-3) a DAB (Vector Lab. č. SK4100). Řezy byly kontrastně barveny methylovou zelení.

β -galaktosidasový test

Nádory byly ponořeny v TBS (Triangle Biomedical Sciences, Durham, North Carolina, USA) a byly rychle zmrazeny v lázni 2-

methylobutan/suchý led. Zmrazené tkáňové řezy (tloušťky 8 μm) byly fixovány v 0,5% glutaraldehydu při 4 °C po dobu 5 minut a potom byly testovány na expresi β -gal způsobem popsáným výše.

FACS analýza integrinu

Buňky byly suspendovány pomocí 0,02% EDTA, byly peletovány a potom byly promyty 2x PBS. Potom byly buňky resuspendovány v koncentraci 1×10^6 buněk/ml a byly inkubovány s primárními protilátkami (konečná koncentrace 1:250/ml) při 4 °C po dobu 1 hodiny. Buněčné suspenze byly promyty 2x PBS pro odstranění nadbytku primární protilátky. Potom byly buňky inkubovány s FITC-konjugovanou králičí anti-myší pomocnou protilátkou (konečná koncentrace 1:250/ml, Zymed) při 4 °C po dobu 1 hodiny. Buňky byly opět promyty PBS a ihned byly analyzovány. Fluorescence byla měřena za použití FACS Vantage průtokového cytometru (Becton Dickinson, Mountain View, California, USA). Vedlejší rozptyl a rozptyl vpřed byly stanoveny simultánně a všechna data byla zpracovávána za použití počítače Hewlett Packard vybaveného FACS research softwarem (Becton Dickinson). Primární protilátky použité pro detekci receptorů pro integriny byly získány od následujících dodavatelů: anti- α_v (12084-018, Gibco BRL; anti- β_3 (550036, Becton Dickenson); anti- $\alpha_v\beta_3$ (MAP1976, Chemicon); anti- β_1 (550034, Becton Dickenson); a anti- $\alpha_v\beta_5$ (MAB 1961, Chemicon).

Výsledky

Transformační účinnost adenoviru a inhibice růstu způsobená p53 in vitro

MDA-MB-231 a MDA-MB-468 buňky byly vysoce účinně transformovány in vitro při m.o.i. 10. Naopak, MDA-MB-435 buňky

byly transformovány ojediněle, a to i při 100 m.o.i. Pro MDA-MB-231 buňky bylo 8% (10 m.o.i.), 46% (50 m.o.i.) a 62% (100 m.o.i.) buněk transformováno β -gal Ad. Pro MDA-MB-468 buňky bylo β -gal Ad transformováno 78% (10 m.o.i.), 84% (50 m.o.i.) a 97% (100 m.o.i.) buněk. Pro MDA-MB-435 buňky bylo β -gal Ad transformováno 0,5% (10 m.o.i.), 1% (50 m.o.i.) a 1,3% (100 m.o.i.) buněk.

Infekce 50 m.o.i. p53 Ad vedla téměř ke kompletní smrti buněk v kulturách MDA-MB-468 a MDA-MB-231 buněk. Naopak, p53 Ad neměl žádný detekovatelný vliv na MDA-MB-435 buňky.

Účinnost p53 Ad proti xenotransplantátům lidského karcinomu prsu

p53 genová terapie zprostředkovaná adenovirem byla vysoce účinná proti xenotransplantátům MDA-MB-468 a MDA-MB-231 buněk (obr. 3a a 3b. V pokusu s MDA-MB-231 byla 1 myš ve skupině β -gal Ad a 3 myši ve skupině p53 Ad bez nádoru na konci pokusu a všechny nádory regredovaly během léčby p53 Ad. Inhibice růstu -231 nádorů byla průměrně 86% ($p \leq 0,01$). Složka inhibice růstu způsobené p53 byla průměrně 37%, zatímco inhibice specifická pro adenovirus byla průměrně 49% ($p \leq 0,01$). Inhibice růstu -468 nádorů byla průměrně 74% ($p \leq 0,001$). Jedna myš ve skupině p53 Ad byla bez nádoru na konci pokusu a všechny nádory regredovaly během léčby p53 Ad. Inhibice růstu -468 nádorů způsobená p53 byla průměrně 45% ($p < 0,001$), zatímco inhibice specifická pro adenovirus byla průměrně 28% ($p \leq 0,05$). V žádném pokusu nebyly pozorovány vedlejší účinky. Hodnoty ED_{50} pro inhibici růstu -231 a -468 nádorů byly 3×10^8 C.I.U. (buněčných infekčních jednotek), resp. 2×10^8 C.I.U. (obr. 4). -435 nádory byly téměř úplně resistantní na léčbu p53

Ad (obr. 3c). Inhibice růstu ve skupině -435 nádorů léčených adenovirem nebyla statisticky významná.

Obr. 5 ukazuje srovnání účinnosti dvou režimů podání p53 Ad při léčbě -231 nádorů. Všem myším bylo podáno 5 perinádorových injekcí za týden. Všechny myši léčené terapeutickým činidlem (p53 Ad) dostaly celkem $2,2 \times 10^9$ C.I.U./myš/týden. Jedné skupině byla podána jediná bolusová injekce celé týdenní dávky adenoviru. Další 4 injekce pro daný týden obsahovaly vehikulum (skupina IX). V dalších léčených skupinách byla podána stejná dávka Ad rozdělená do 5 injekcí za týden (skupina 5X). Tento dávkovací režim byl podán během týdnů 1 a 3 (dny 0-4, 14-18). Inhibice růstu byla průměrně 73% pro skupinu 5X ($p < 0,01$), ale pouze 44% pro skupinu 1X ($p < 0,05$ pro první tři týdny pokusu, nesignifikantní po dnu 21). První cyklus genové terapie p53 byl účinnější než druhý cyklus. Po prvním cyklu byly 4 myši ve skupině 1X, 5 myši ve skupině 5X a 1 myš v kontrolní skupině (vehikulum) bez nádoru. U jedné myši ve skupině 5X došlo k relapsu velmi malého nádoru v den 21. Po druhém cyklu terapie nebylo pozorováno žádné další "vyléčení".

Obr. 6 ukazuje pokusy na 468 nádorech, které byly na počátku 4-krát větší než 468 nádory uvedené na obr. 3b a které byly léčeny 10-krát nižší dávkou adenoviru. Byla podána celková dávka $2,2 \times 10^8$ C.I.U./myš/týden. Jedné skupině byla podána jediná bolusová injekce viru a další 4 injekce pro daný týden obsahovaly pufr (skupina IX). Další léčené skupině byla podána stejná dávka Ad rozdělená do 5 injekcí za týden (skupina 5X). Tyto dávkovací režimy byly podávány po dobu 6 týdnů. Celková podaná dávka viru byla přibližně poloviční ve srovnání s dávkou použitou na obr. 3. Toto schema dávkování mělo cytostatický účinek na objem nádoru u myší léčených p53 Ad ($p \leq 0,05$). Dávky podané v pokusu dříve se jevily jako účinnější než dávky podané

později. Jedna myš ve skupině 5X byla bez nádoru v den 21. Nicméně, pokud byla srovnávána inhibice růstu nádoru u všech myší, tak bylo schema IX (60%) o něco účinnější, ale ne statisticky významně účinnější, než schema 5X (55%). Za jeden týden po skončení dávkování se rychlost růstu nádorů ve skupině 5X začala zvyšovat. Jeden měsíc po zahájení studie začaly nádory ve skupině léčené vehikulem nekrotizovat a dosáhly fáze plató.

In vivo infekčnost po opakované expozici adenoviru

Na konci studií uvedených na obr. 5 a 6 byla do některých nádorů podána injekce β -gal Ad. Tyto nádory byly odebrány o 24 hodin později a zmrazené tkáňové řezy byly vyšetřovány na expresi β -galaktosidasy. Nádory léčené p53 Ad po dobu 2 nebo 6 týdnů ještě stále exprivovaly β -gal Ad, ačkoliv transformace byla nejnižší u -468 nádorů léčených po dobu 6 týdnů p53 Ad 5x týdně. V řezech pouze z 1 ze 3 -468 nádorů ve skupině 5X byly identifikovány buňky exprivující β -galaktosidasu.

Indukce apoptosy p53 Ad in vivo

Do xenotransplantátů MDA-MB-231 a MDA-MB-468 karcinomu prsu na holých myších bylo podáno injekčně $1-5 \times 10^8$ C.I.U. p53 Ad nebo pufru 48 až 72 hodin před odběrem. Indukce apoptosy způsobená p53 Ad byla stanovena za použití Apoptag imunohistochemické metody na tkáňových řezech. U nádorů, do kterých byl aplikován p53 Ad, byly prokázány rozsáhlé plochy apoptotických buněk podél dráhy jehly u intranádorové aplikace a v zevní hranici nádorů u perinádorové aplikace. Naopak, u nádorů s aplikací pufru byly identifikovány pouze rozptýlené apoptotické buňky, jak bylo očekáváno.

Srovnání exprese integrinu u MDA-MB-231 a MDA-MB-435 buněk

FACS analýza exprese integrinu byla provedena na MDA-MB-231 a MDA-MB-435 buňkách pro určení toho, zda nízký stupeň transformace MDA-MB-435 buněk byl způsoben deficitem α_v integrinů nutných pro internalizaci Ad typů 2, 3 a 4 (Wickham et al. (1993) Cell 73: 309-319; Wickham et al. (1994) J. Cell Biol. 127: 257-264; a Mathias et al. (1994) J. Virol. 68: 6811-6814). Oba typy buněk exprivovaly α_v , $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ a β_1 integriny přibližně na stejné úrovni. Expresse integrinu $\alpha_v\beta_3$ a β_3 byla vyšší na MDA-MB-435 buňkách než na MDA-MB-231 buňkách.

Diskuse: Při aplikaci $2,2 \times 10^9$ C.I.U. p53 Ad v 10 injekcích je inhibice růstu nádoru 74% pro MDA-MB-468 nádory a 86% pro MDA-MB-231 nádory, ale žádná významná inhibice není prozorována pro MDA-MB-435 nádory. U MDA-MB-468 nádorů je 61% celkové odpovědi specifických pro p53, zatímco u MDA-MB-231 nádorů je 43% celkové odpovědi specifických pro p53. Schopnost β -gal Ad transformovat MDA-MB-231, MDA-MB-468 a MDA-MB-435 buňky in vitro je obvykle prediktivní pro výsledky in vivo. Při stejné koncentraci viru mají MDA-MB-468 buňky o něco vyšší rychlost transformace než MDA-MB-231 buňky, zatímco MDA-MB-435 buňky jsou resistantní na transformaci adenovirem. Výsledky pro MDA-MB-435 buňky získané in vitro korelují velmi špatně odpovědi in vivo.

Bylo prokázáno, že systémová léčba holých myší s MDA-MB-435 nádory vektorem p53-liposom způsobuje inhibici růstu nádoru a v některých případech regresi nádoru (Lesoon-Wood et al. (Hum. Gene. Ther. 6: 395-405). Léčba p53-liposomy také redukuje počet plicních metastas. Tyto výsledky naznačují, že chybění odpovědi MDA-MB-435 nádorů na terapii p53 Ad nebylo způsobeno neschopností inhibovat růst a metastasování MDA-MB-435 nádorů.

Pravděpodobněji bylo toto chybění odpovědi na léčbu p53 Ad způsobeno nízkou účinností adenovirové transformace MDA-MB-435 buněk.

α_v integriny se považují za buněčné elementy nutné pro účinnou internalizaci adenovirů typu 2, 3 a 4 (Wickham (1993) výše; Wickham (1994), výše; a Mathias (1994), výše). Je pravděpodobné, že α_v integriny mají stejnou úlohu pro Ad typu 5. Wickham et al. (1994), výše, pozoroval 5-10-násobně vyšší internalizaci rekombinantního adenoviru typu 5 v buňkách transformovaných $\alpha_v\beta_5$ ve srovnání s buňkami bez exprese α_v nebo s buňkami transformovanými $\alpha_v\beta_3$. Zde použité -293 buňky lidské embryonální ledviny použité pro produkci p53 Ad exprivují $\alpha_v\beta_1$ integriny, ale nikoliv $\alpha_v\beta_3$ integriny (Bodary (1990) J. Biol. chem. 265: 5938-5941). Proto se zdá rozumné měřit expresi α_v , β_1 , β_3 a α_5 integrinových podjednotek na -435 buňkách. MDA-MB-231 a MDA-MB-435 buňky exprivují přibližně stejná množství molekul integrinové rodiny. Proto není chybění Ad transformace MDA-MB-435 buněk způsobeno deficitem v expresi α_5 integrinu. V současnosti není v literatuře známá totožnost buněčných receptorů nutných pro vazbu Ad na cílové buňky. Je možné, že MDA-MB-435 buňky jsou deficitní pro tento receptor nebo pro nějakou jinou složku nutnou pro vazbu viru, pro internalizaci nebo pro genovou expresi.

Přetrvávající účinnost p53 Ad během opakovaných cyklů terapie byla vyšetřována na MDA-MB-231 a MDA-MB-468 nádorových modelech. Zdá se, že účinnost se snižuje s pokračujícím podáváním; nicméně, tento účinek musí být prozkoumán podrobněji. Převažující teorie tvrdí, že infekce adenovirem vyvolává rychlou zánětlivou a cytolytickou odpověď zprostředkovanou cytotoxickými T buňkami u hostitele s plně

funkčním imunitním systémem (Wilson (1995), Nature Med. 4: 887 - 889). Tato odpověď T buněk je stimulována adenovirovými antigeny produkovanými v hostitelských buňkách a presentovanými spolu s MHC molekulami na povrchu buněk. Neutralizační protilátky specifické pro cílové buňky transformované adenovirem jsou produkovány v imunitní odpovědi později a soudí se, že jsou odpovědné za redukovanou schopnost adenoviru reinfikovat hostitelské buňky po počáteční inokulaci. Athymické holé myši použité v těchto pokusech měly defektní T-buněčnou imunitní odpověď na cizorodé antigeny, ale byly schopné B-buňkami zprostředkované protilátkové odpovědi (Boven (1991) The Nude Mouse in Oncology Research, Boston: CRC Press). Produkce neutralizačních anti-adenovirových protilátek může vysvětlit redukovanou účinnost terapie p53-adenovirem (p53 Ad) s postupujícím podáváním dávky v presentovaných pokusech. Porušená funkce imunitního systému u holých myší a špatné krevní zásobení centra nádorových xenotransplantátů může vysvětlit částečnou účinnost p53 Ad I po 6 týdnech léčby a schopnost β -gal Ad infikovat malé množství nádorových buněk i po opakovaných injekcích p53 Ad.

Kromě nádorů prsu bylo velké množství nádorů léčeno rekombinantními adenoviry exprimujícími přirozený p53. Mezi tyto studie patří modely karcinomu čípku děložního (Hamada (1996) Cancer Res. 56: 3047-3054), karcinomu prostaty (Eastham (1995) Cancer Res. 55: 5151-5155), nádorů hlavy a krku (Clayman (1995) Cancer Res. 55: 1-6), karcinomu plic (Wills (1994), výše), karcinomu vaječníků (13), glioblastomu (27, 28) a kolorektálního karcinomu (13, 29). Dohromady tyto studie podporují probíhající klinický výzkum hodnocení účinků adenovirem zprostředkované terapie genem p53. Předkládané výsledky demonstrují schopnost přirozeného p53 omezit růst nádorových buněk in vivo u xenotransplantátů nádoru prsu

exprimujících mutantní p53. Tyto studie také potvrzují, že adenoviru je účinným prostředkem pro přenos p53, pokud exprivují cílové buňky odpovídající virové "receptory".

Příklad 4: Další výzkum léčebných režimů pro inhibici nádorů

Vynález dále obsahuje způsoby pro léčbu různých nádorů podáním nukleové kyseliny exprivující tumor-supresorový polypeptid, které využívají různých schemat dávkování. Následující příklad popisuje vyšší účinnost rozděleného dávkování při podání adenoviru exprivujícího p53 podle předkládaného vynálezu.

Pro srovnání účinků režimu jedné dávky s režimem více dávek za určitou dobu byla SCID myším s implantovanými MDA-MB-468 a MDA-MB-231 nádory podána celková dávka 1×10^9 I.U. p53 Ad (A/C/N/53) na myš, která byla podána buď jako bolusová injekce, nebo ve 3 nebo 5 dávkách podaných jednou denně během týdne (jak ukazují šipky na obr. 7).

Výsledky získané pro MDA-MB-468 nádory byly podobné jako výsledky získané pro MDA-MB-231 nádory, jak je uvedeno na obr. 7a, 7b a 7c. Obecně, režimy obsahující více dávek inhibují růst nádoru lépe než jediná bolusová injekce, kdy režim 5 injekcí je významně lepší než režim 3 injekcí.

Příklad 5: Dexmethason mírní inhibici růstu nádorů spojenou s anti-adenovirovou imunitní odpovědí zprostředkovanou NK-buňkami

Bylo prokázáno, že opakované podání adenovirových vektorů může indukovat imunitní odpověď proti adenoviru. Pro výzkum toho, zda mohou imunosupresivní vlastnosti nízkých dávek

dexamethasonu (dex) inhibovat imunitní odpověď proti adenoviru (například odpověď NK buněk) byly MDA-MB-231 nádory u SCID myši léčeny rekombinantním virem podle předkládaného vynálezu za absence nebo za přítomnosti dexamethasonu.

Přibližně 5×10^6 MDA-MB-231 buněk/myš bylo injekčně podáno do tukové vrstvy prsní žlázy samic SCID myši v den 0. V den 11 byly podkožně implantovány pelety obsahující dexamethason nebo placebo. 5 mg pelety byly navrženy tak, aby uvolňovaly 83,3 μg dexamethasonu/den kontinuálně po dobu 60 dnů (Innovative Research of America, Sarasota, FL). Všem myším bylo podáno celkem 10 perinádorových injekcí podaných jednou denně v dny 14-18 a 21-25 (0,1 ml na injekci). Celková dávka viru byla 2×10^9 C.I.U./myš (p53 Ad (A/C/N/53) nebo β -galaktosidasa Ad). Léčba je uvedena v tabulce 5.

Tabulka 5: Léčba MDA-MB-231 nádorů u SCID myši

Skupina	Hormon	genová terapie
1	placebo	pufr
2	placebo	β -gal Ad
3	placebo	p53 Ad
4	dexamethason	pufr
5	dexamethason	β -gal Ad
6	dexamethason	p53 Ad

Léčba nízkými dávkami dexamethasonu neměla statisticky významný vliv na růst MDA-MB-231 nádorů u SCID myši ($p > 0,05$). Nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky dexamethasonu. Léčba nádorů β -gal adenovirem způsobila signifikantní inhibici růstu nádorů u kontrolních nádorů s podáváním placebo ($p \leq 0,001$, dny 21-30), ale ne ve skupině léčené dexamethasonem ($p > 0,05$, viz

29.10.99

obr. 8). Nádory léčené placebem a β -gal Ad rostly pomaleji, než nádory léčené placebem a dexamethasonem ($p \leq 0,01$, dny 23-30).

Nebyla pozorována signifikantní p53-specifická inhibice růstu nádorů ve skupině kontrolních nádorů léčených placebem ($p > 0,05$). Naopak, nádory léčené dexamethasonem a p53 Ad rostly významně pomaleji, než nádory léčené dexamethasonem a β -gal Ad ($p \leq 0,02$, dny 21-30) nebo placebem a p53 Ad ($p \leq 0,04$, dny 21-30).

Léčba nízkými dávkami dexamethasonu tak mírní inhibici růstu nádorů spojenou s anti-adenovirovou imunitní odpovědí (např. zprostředkovanou NK-buňkami) u SCID myši bez nežádoucích vedlejších účinků. Tato data také naznačují, že léčba nízkými dávkami dexamethasonu může stimulovat expresi transgenu (například p53) řízenou CMV promotorem v rekombinantním adenoviru. Naopak, dexamethason může zvyšovat transdukční účinnost adenoviru a tak zvyšovat odumírání nádorových buněk.

Model MDA-MB-231 karcinomu prsu byl potom použit pro hodnocení protinádorové účinnosti Ad s nebo bez p53 u myši lišících se schopností imunitní odpovědi na cizorodé antigeny. Byly studovány holé myši s nefunkčními T-buňkami, SCID myši s nefunkčními T a B buňkami, ale se zvýšeným množstvím NK buněk a SCID-beige myši s nefunkčními T, B a NK buňkami.

Pro výzkum účinnosti rAd5/p53 (popsaný výše) proti MDA-MB-231 xenotransplantátům byla: holým myším podána celková dávka $2,2 \times 10^9$ C.I.U. Ad na myš v 10 injekcích v den 0 až 4 a 7 až 11; SCID myším podána celková dávka 4×10^9 C.I.U. Ad na myš v 10 injekcích v den 0 až 4 a 7 až 11; SCID-beige myším podána celková dávka $1,6 \times 10^9$ C.I.U. Ad na myš v 10 injekcích v den 0

29.10.99

až 4 a 7 až 11. Všem myším byl podán p53 Ad, β -gal Ad nebo vehikulum samotné.

U holých myší (s nefunkčními T buňkami) a u SCID myší (s nefunkčními T a B buňkami, ale se zvýšenými NK buňkami) způsobilo intranádorové podání kontrolního Ad vektoru (bez p53 insertu) určitou inhibici růstu nádoru. Ad exprimující p53 (rAd5/p53) měl výrazně vyšší protinádorovou účinnost ve srovnání s kontrolním Ad. Naopak, u SCID-beige myší (s nefunkčními T, B a NK buňkami) byla veškerá protinádorová účinnost způsobena p53, bez složky Ad vektoru v inhibici růstu nádoru. Tato data ukazují na dříve neznámou úlohu NK buněk v inhibici nádorového růstu zprostředkované adenovirem. Tato data také naznačují, že suprese imunitního systému může zrušit některé vedlejší účinky specifické pro vektor, které jsou zprostředkované NK buňkami.

Příklad 6: Kombinovaná terapie p53 adenovirem a chemoterapie

Vynález obsahuje kombinované podání nukleové kyseliny exprimující tumor-supresorový polypeptid a chemoterapeutického činidla při léčbě nádorů. Následující příklad popisuje schopnost adenoviru exprimujícího p53 podle předkládaného vynálezu v kombinaci s různými protinádorovými léky, jako je cis-platina, doxorubicin, 5-fluoruracil (5-FU), methotrexat a etoposid, léčit nádory a dále popisuje to, že kombinovaná terapie je účinnější, t.j. synergní, v působení na nádorové buňky, než terapie každým činidlem samostatně.

p53 podaný s chemoterapeutiky in vitro

Cis-platina, doxorubicin, 5-fluoruracil, methotrexat a etoposid v kombinaci s p53

29.10.99

Účinek klinicky relevantních protinádorových léků cis-platiny, doxorubicinu, 5-fluoruracilu, methotrexatu a etoposidu v kombinaci s tumor-supresorovým vektorem podle předkládaného vynálezu (A/C/N/53), byl zkoumán in vitro. Buňky SCC-9 spinocelulárního karcinomu hlavy a krku, SCC-15 spinocelulárního karcinomu hlavy a krku, SCC-25 spinocelulárního karcinomu hlavy a krku a Du-145 karcinomu prostaty byly léčeny jedním z následujících režimů: v režimu 1 byly buňky nejprve léčeny protinádorovým chemoterapeutickým lékem 24 hodin před léčbou p53 adenovirovým konstruktem A/C/N/53; v režimu 2 byly buňky léčeny nejprve p53 adenovirovým konstruktem a potom byly léčeny protinádorovým chemoterapeutickým lékem; a v režimu 3 byly buňky léčeny současně protinádorovým chemoterapeutickým lékem a p53 adenovirem.

Všechny buněčné linie byly získány od ATCC (Rockville, MD). SCC-9, SCC-15 a SCC-25 buňky nádorů hlavy a krku ($p53^{null}$) byly kultivovány v 1:1 směsi DMEM a Ham F-12 (GIBCO/Life Technologies, Grand Island, NY) s 10% fetálním telecím sérem (FCS; Hyclone, Logan, Utah), 0,4 $\mu\text{g/ml}$ hydrokortisonu (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO) a 1% neesenciálních aminokyselin (GIBCO) při 37 °C a 5% CO_2 . SK-OV-3 lidské ovariální nádorové buňky ($p53^{null}$) a DU-145 lidské prostatické nádorové buňky ($p53^{null}$) byly kultivovány v Eaglově MEM plus 10% FCS při 37 °C a 5% CO_2 . MDA-MB-231 buňky lidského karcinomu prsu ($p53^{mut}$) byly kultivovány v DMEM (GIBCO) s 10% fetálním telecím sérem (Hyclone) při 37 °C a 5% CO_2 . MDA-MB-468 buňky lidského karcinomu prsu ($p53^{mut}$) byly kultivovány v Leibovitzově L-15 mediu (GIBCO) s 10% FCS při 37 °C, bez CO_2 .

29.10.99

MDA-MB-231 buňky karcinomu prsu mají Arg na Lys mutaci v kodonu 280 genu pro p53 a exprimují mutantní p53 (Bartek (1990), výše). Du-145 buňky karcinomu prostaty mají dvě mutace p53 na různých chromosomech, Pro na Leu mutaci v kodonu 223 a Val na Phe mutaci v kodonu 274 (Isaacs (1991) Cancer Res. 51: 4716-4720) a exprimují mutantní p53. SK-OV-3 ovariální nádorové buňky neobsahují p53 (Yaginuma (1992) Cancer Res. 52: 4196-4199). SCC-9 buňky obsahují delecí mezi kodony 274 a 285, která vede k mutaci ve čtecím rámci; v jádrech SCC-9 není detekovatelný žádný imunoreaktivní p53 protein (Jung (1992) Cancer Res. 52: 6390-6393; Caamano (1993) Am. J. pathol. 142: 1131-1139; Min (1994) Eur. J. Cancer 30B: 338-345). SCC-15 buňky obsahují inserci 5 párů bazí mezi kodony 224 a 225; produkují nízké hladiny p53 mRNA, ale ne detekovatelný p53 protein (Min (1994), výše). SCC-25 obsahují ztrátu heterozygotnosti (LOH) na chromosomu 17 a delecí 2 párů bazí v kodonu 209 na zbylé alele; p53 mRNA není detekovatelná v SCC-25 buňkách a v jejich jádře není detekovatelný žádný imunoreaktivní p53 protein (Caamano (1993) výše). Přibližně $1,5 \times 10^4$ buněk v kultivačním mediu (jak je popsáno v příkladu 1) se přidá do každé jamky 96-jamkové mikrotitrační plotny a provede se kultivace po dobu přibližně 4 hodin při 37 °C a v 5% CO₂.

Konstrukce a propagace adenovirů (Ad) exprimujících lidský přirozený p53 a β -galaktosidasu E. coli byla popsána dříve (Wills (1994), výše). Koncentrace infekčních virových částic byla stanovena měřením 293 buněk pozitivních na virový hexonový protein 48 po infekci (Huyghe (1995) výše). C.I.U. označuje buněčné infekční jednotky. Adenoviry exprimující p53 byly podány ve fosfatovém pufru (20 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 130 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2% sacharosa). Do každé jamky byl podán lék, p53 adenovirus nebo vhodné vehikulum/pufr. Pro in vitro pokusy s

p53 Ad byly buňky umístěny na plotnách v hustotě $1,5 \times 10^4$ buněk/jamku 96-jamkové plotny a provedla se kultivace po dobu 4 hodin při 37°C a v 5% CO_2 . Lék, p53 Ad nebo vhodné vehikulum se přidalo do každé jamky a kultivace pokračovala přes noc. Potom se lék, p53 Ad nebo vhodné vehikulum se přidalo do každé jamky a kultivace pokračovala po dobu další 2 dnů.

Smrt buněk se kvantifikovala za použití MTT testu, který popsal Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65: 55-63. Stručně, 25 μl 5 mg/ml MTT vital barviva [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylyltetrazoliumbromid] se přidalo do každé jamky a provedla se inkubace po dobu 3-4 hodin při 37°C a v 5% CO_2 . Potom se do každé jamky přidalo 100 μl 10% SDS detergentu a provedla se inkubace přes noc při 37°C a v 5% CO_2 . Signál v každé jamce je kvantifikován za použití čtečky mikroploten (Molecular devices).

Ve všech případech bylo použití cis-platiny (viz tabulka 6, souhrnné výsledky), doxorubicinu (viz tabulka 7, souhrnné výsledky), 5-FU, methotrexatu a etoposidu v kombinované terapii účinnější v usmrcení buněk než terapie každým činidlem zvlášť. Kombinace methotrexatu a p53 Ad byla testována na jedné buněčné linii. Když byly SCC-15 buňky ošeteřeny $0,7 \mu\text{M}$ methotrexatu 24 hodin před podáním 5 m.o.i. p53 Ad, byl kombinovaný antiproliferativní účinek těchto dvou léčiv pouze o 5% vyšší než účinek p53 samotného, ačkoliv nebyl tento rozdíl statisticky významný ($p \leq 0,003$). Předléčení Du-145 buněk $2,6 \mu\text{M}$ etoposidu 24 hodin před ošetřením 5 nebo 10 m.o.i. p53 Ad vedlo k většímu kombinovanému účinku než podání léků samostatně ($p \leq 0,0001$). Když byly SCC-15 buňky ošeteřeny $0,3 \mu\text{M}$ etoposidu 24 hodin před podáním 5 m.o.i. p53 Ad, byl kombinovaný antiproliferativní účinek těchto dvou léčiv pouze o 5% vyšší než účinek p53 samotného, ačkoliv nebyl tento rozdíl

29.10.99

statisticky významný ($p \leq 0,003$). Kombinace terapie tumor-supresorovým genem a protinádorovým činidlem nevykazovala antagonistické účinky.

Ve druhém pokusu byl účinek léčby na normální buňky (MRC-9) srovnáván s účinkem na buňky nádorové (obr. 9). V tomto pokusu byl růst hodnocen spíše podle inkorporace ^3H -thymidinu, než MTT testem. Normální buňky (diploidní fibroblasty MRC-9) nevykazovaly zvýrazněné účinky při kombinované terapii. Jak bylo očekáváno, účinek tumor-supresorového činidla samotného byl u normálních buněk zanedbatelný a byl vysoce signifikantní u buněk nádorových. Naopak, protinádorové činidlo samotné (například cis-platina, doxorubici, 5-FU, methotrexat a etoposid) bylo účinnější u normálních buněk než u buněk nádorových (viz obr. 9).

Tabulka 6: Antiproliferativní účinky p53 Ad v kombinaci s cis-platinou

Vyšší účinnost v kombinaci?

Buněčná linie	p53 protein	Typ tkáně	První cis-platina	První p53 Ad	Simultánně
SK-OV-3	bez	ovarium	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$
SCC-9	bez	hlava a krk	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$
SCC-15	bez	hlava a krk	ano $p \leq 0,0001$	ND	ND
SCC-25	bez	hlava a krk	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$
MDA-MB-468	mutantní	prs	ano $p \leq 0,0001$	ND	ano $p \leq 0,0001$
MDA-MB-231	mutantní	prs	ano $p \leq 0,0002$	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$

ND = neprovedeno

29.10.99

Tabulka 7: Antiproliferativní účinky p53 Ad v kombinaci s doxorubicinem

Vyšší účinnost v kombinaci?

Buněčná linie	p53 protein	Typ tkáně	První doxorubicin	První p53 Ad	Simultánně
SK-OV-3	bez	ovarium	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$
SCC-9	bez	hlava a krk	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$
SCC-15	bez	hlava a krk	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$
SCC-25	bez	hlava a krk	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$
Du-145	mutantní	prostata	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$
MB-231	mutantní	prs	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$	ano $p \leq 0,0001$

Účinky doxorubicinu a p53 na lidský hepatocelulární karcinom

Následující příklad popisuje schopnost adenoviru exprimujícího p53 podle předkládaného vynálezu v kombinaci s doxorubicinem léčit nádory a dále popisuje to, že kombinovaná terapie je účinnější, t.j. synergní, v působení na nádorové buňky, než terapie každým činidlem samostatně. Výsledky demonstrují synergistickou kombinaci mezi p53 expresním vektorem podle předkládaného vynálezu (A/C/N/53) a doxorubicinem.

29.10.99

Doxorubicin (Adriamycin) a p53 (A/C/N/53. rekombinantní adenovirový konstrukt exprimující přirozený lidský p53 transgen) byly testovány na následujících buněčných liniích: HLE, buněčná linie lidského hepatocelulárního akrcinomu (Hsu (1993) Carcinogenesis 14: 987-992; Farshid (1992) J. Med. Virol. 38: 235-239; Dor (1975) Gann. 66: 385-392), s mutovaným p53; HLF, buněčná linie lidského hepatocelulárního akrcinomu s mutovaným p53 (ibid); Hep 3B, buněčná linie lidského hepatocelulárního akrcinomu bez p53 (Hasegawa (1995) In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. 31: 55: 55-61; Hep G2, buněčná linie lidského hepatocelulárního akrcinomu s přirozeným p53 (ibid); a SK-HEP-1, lidský adenokarcinom jater s přirozeným p53 (Lee (1995) FEBS Lett. 368: 348-352). Životaschopnost buněk byla měřena za použití calcein AM sondy pro živé buňky (Molecular Probes) (viz například Poole (1993) J. Cell Sci. 106: 685-691). Substrát calcein AM je štěpen buněčnými esterasami za vzniku fluorescentní sloučeniny.

Buňky byly umístěny v 96-jamkových plotnách (5×10^3 buněk/jamku), nechaly se přes noc adherovat, trojitě se ošetřily různými ředěními A/C/N/53 a doxorubicinu v den 0, takže byla stanovena křivka dávka-odpověď pro doxorubicin a každou dávku A/C/N/53. V den 3 bylo medium aspirováno a k buňkám byl přidán calcein AM v PBS. Intenzita fluorescence každé jamky byla určena za použití čtečky mikroploten. Hodnoty fluorescence z jamek bez buněk byly odečteny a hodnoty byly vyjádřeny jako procento životaschopnosti (intenzity fluorescence) vzhledem k neošetřeným kontrolním jamkám. Pro vytvoření isobolografů pro stanovení interakcí mezi A/C/N/53 a doxorubicinem byly použity hodnoty EC_{50} .

Isobologramová analýza pro každou buněčnou linii ukazuje synergní interakce mezi p53 exprimujícím vektorem podle

29.10.99

předkládaného vynálezu (A/C/N/53) a doxorubicinem; tato synergie byla nezávislá na p53 stavu buněčné linie. Nicméně, ED₅₀ pro A/C/N/53 za absence doxorubicinu je vyšší u buněčných linií s přirozeným p53 než u buněčných linií s alterovaným p53.

V jiném pokusu byly HLE buňky umístěny v 96-jamkových plotnách (5×10^3 buněk/jamku), nechaly se přes noc adherovat, ošetřily různými ředěními A/C/N/53 (trojmo) a doxorubicinu v den 0, takže byla stanovena křivka dávka-odpověď pro doxorubicin a každou dávku A/C/N/53. Tři skupiny byly použity pro testování účinků pořadí dávek na interakce mezi A/C/N/53 a doxorubicinem.

skupina	den 0	den 1	den 2	den 3
simultáně	A/C/N/53, doxorubicin			odběr
první A/C/N/53	A/C/N/53	doxorubicin		odběr
první doxorubicin	doxorubicin	A/C/N/53		odběr

Buňky byly inkubovány po dobu tří dnů po první léčbě. Medium bylo aspirováno a k buňkám byl přidán calcien AM v PBS. Intenzita fluorescence v každé jamce byla určena pomocí čtečky fluorescence mikroplosten. Hodnoty fluorescence z jamek bez buněk byly odečteny a hodnoty byly vyjádřeny jako procento životaschopnosti (intenzity fluorescence) vzhledem k neošetřeným kontrolním jamkám. Pro vytvoření isobolografů pro stanovení interakcí mezi A/C/N/53 a doxorubicinem byly použity hodnoty EC₅₀. Isobologramová analýza pro každý režim ukazovala na podobné interakce odpovídající synergii mezi A/C/N/53 a doxorubicinem u HLE buněk, kde tato synergie nebyla závislá na pořadí podání dávek.

29.10.99

p53 s chemoterapeutickými léky in vivo

Účinek klinicky relevantních protinádorových léků (cis-platiny, doxorubicinu a 5-fluoruracilu (5-FU)) v kombinaci s tumor-supresorovým vektorem podle předkládaného vynálezu (A/C/N/53) byl dále zkoumán in vivo.

C.B. 17/ICR-scid myši byly zakoupeny od Taconic Farms (Germantown, NY) nebo od Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Athymické nu/nu myši byly získány od Charles River Laboratories. Všechny myši byly chovány ve VAF-barrier boxech a všechny pokusy na zvířatech byly provedeny podle pravidel uvedených v N.I.H Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Objemy nádorů pro každou skupinu každý den byly srovnávány za použití Student testu pomocí Statview II softwaru (Abacus Concepts, Berkeley, California). Byly vypracovány křivky růstu nádorů a ukazují průměrný objem nádoru $\pm$ s.e.m. Obvykle bylo 10 myší na skupinu.

Model SK-OV-3 nádoru ovaria

Uchycené intraperitoneální SK-OV-3 nádory byly léčeny intraperitoneálními dávkami vehikula, p53 Ad, cis-platiny nebo oběma léky. Myším bylo podáno šest injekcí p53 Ad během dvou týdnů. Celková dávka viru byla $1,5 \times 10^9$ C.I.U. ($3,1 \times 10^{10}$ virových částic).

Účinnost cis-platiny: Samicím scid myší bylo injekčně podáno 5×10^6 SK-OV-3 ovariálních nádorových buněk, i.p. v den 0. Ve dny 6, 8, 10, 13, 15 a 17 byly myším podávány dávky (p53 Ad pouze v den 17). Byl podáván celkový objem 0,2 ml (0,1 ml vehikula pro cis-platinu nebo cis-platina plus 0,1 Ad pufru nebo p53 Ad). Dávka p53 byla $2,5 \times 10^8$ C.I.U./myš/den ($5,2 \times$

29.10.99

10^9 virových částic). Dávka cis-platiny byla 2 mg/kg/den. Nádory byly odebrány a zváženy v den 20.

Myši v jedné léčené skupině dostaly pět dávek cis-platiny simultánně s prvními pěti dávkami p53 Ad. Tato dávka p53 Ad redukovala růst nádorů u myši pouze o 17% v den 20 ($p \leq 0,01$). Nicméně, při kombinaci s cis-platinou způsobil p53 Ad 38% redukci růstu nádorů ve srovnání s podáním cis-platiny samotné ($p \leq 0,0008$). Myši léčené vehikuly nebo p53 Ad samotným měly krvavý ascites a invazivní nádorové uzly na bránici. Tyto příznaky nebyly přítomné u myši léčených cis-platinou samotnou nebo cis-platinou s p53 Ad.

Účinnost cis-platiny/paclitaxelu: Samičím scid myši bylo injekčně podáno $2,5 \times 10^6$ SK-OV-3 ovariálních nádorových buněk, i.p. v den 0. Ve dny 7, 9, 11, 16 a 18 byly myším podávány dávky. Byl podáván celkový objem 0,3 ml (0,1 ml vehikula pro cis-platinu nebo cis-platina plus 0,1 vehikula pro paclitaxel nebo paclitaxel plus 0,1 Ad pufru nebo p53 Ad). Dávka p53 Ad byla $2,5 \times 10^8$ C.I.U./myš/den ($5,2 \times 10^9$ virových částic). Dávka cis-platiny byla 0,5 mg/kg/den. Dávka paclitaxelu byla 1 mg/kg/den. Nádory byly odebrány a zváženy v den 30. $n = 7 = 10$ myši na skupinu.

V této druhé studii byly SK-OV-3 ovariální nádory léčeny intraperitoneálními dávkami vehikula, p53 Ad, cis-platiny a paclitaxelu nebo všemi třemi léky zároveň. Kombinace všech tří léků redukovala růst nádorů o 34% více než kombinace cis-platiny a paclitaxelu, což ukazuje na vyšší účinnost trojkombinace ($p \leq 0,0006$).

Model Du-145 nádoru prostaty

29.10.99

Účinnost cis-platiny: Intraperitoneální Du-145 nádory byly léčeny intraperitoneálními dávkami vehikula, p53 Ad, cis-platiny nebo oběma léky zároveň. Samcům scid myši bylo injekčně podáno $2,5 \times 10^6$ Du-145 buněk, i.p. v den 0. Ve dny 7, 9, 11, 14 a 16 byly myším podávány dávky. Byl podáván celkový objem 0,2 ml (0,1 ml vehikula pro cis-platinu nebo cis-platina plus 0,1 Ad pufry nebo p53 Ad). Dávka p53 byla $8,3 \times 10^8$ C.I.U./myš/den ($2,9 \times 10^{10}$ PN). Dávka cis-platiny byla 1 mg/kg/den. Nádory byly odebrány a zváženy v den 22. Kombinace p53 Ad a cis-platiny měla výrazně vyšší protinádorovou účinnost ve srovnání s každým lékem samostatně ($p \leq 0,0004$).

Model MDA-MB-468 nádoru prsu

Účinnost cis-platiny: Uchycené MDA-MB-468 nádory byly léčeny buď vehikulem, nebo p53, nebo cis-platinou nebo oběma léky. Samičím scid myši bylo injekčně podáno 1×10^7 MDA-MB-468 buněk do tukové vrstvy prsní žlázy, 11 dní před podáním první dávky v den 0. Intraperitoneální dávka cis-platiny byla 1 mg/kg/den. Intranádorová dávka p53 Ad byla $8,3 \times 10^8$ C.I.U./myš/den ($2,9 \times 10^{10}$ virových částic) podaných simultáně ve dny 0-4. p53 Ad měl vyšší účinnost při kombinaci s cis-platinou (dny 8-31, $p \leq 0,0004$).

Účinnost doxorubicinu: Ve druhém pokusu byly MDA-MB-468 nádory léčeny buď vehikulem, nebo p53, nebo doxorubicinem nebo oběma léky. Samičím scid myši bylo injekčně podáno 1×10^7 MDA-MB-468 buněk subkutánně, 12 dní před podáním první dávky v den 0. Intraperitoneální dávka doxorubicinu byla 4 mg/kg/den v den 0, 2, 7 a 9. Intranádorová dávka p53 Ad byla 5×10^8 C.I.U./myš/den ($1,03 \times 10^{10}$ virových částic) ve dny 0-4 a 7-11. p53 Ad měl vyšší účinnost při kombinaci s doxorubicinem (dny 14-24, $p \leq 0,05$).

Model SCC-15 nádoru hlavy a krku:

Účinnost 5-fluorouracilu: Subkutání SCC-15 nádory byly léčeny buď vehikulem, nebo p53, nebo 5-fluorouracilem nebo oběma léky. Scid myším bylo injekčně podáno 5×10^6 SCC-15 buněk subkutánně, 7 dní před podáním první dávky v den 0. Intraperitoneální dávka 5-fluorouracilu byla 50 mg/kg/den ve 40% hydroxypropyl- β -cyklodextranu (Cerestar Inc., Hammond, IN) v den 0, 7 a 14. Dávka p53 Ad byla 2×10^8 C.I.U./myš/den (4×10^9 virových částic) ve dny 0, 1, 7, 8, 14 a 15 (6 intranádorových injekcí během 3 týdnů). Dávka 5-FU byla 50 mg/kg. Kombinace p53 Ad a 5-FU měla vyšší protinádorovou účinnost než podání každého léku zvlášť, ($p \leq 0,04$).

p53 s FPT inhibitorem

Účinnost inhibitoru farnesyl-protein transferasy v kombinaci s tumor-supresorovým vektorem označeným A/C/N/53 byla zkoumána in vitro. Následující příklad popisuje schopnost adenoviru exprimujícího p53 podle předkládaného vynálezu v kombinaci s FPT inhibitorem označeným "FPT39", jak je popsán v mezinárodní přihlášce WO 97/23478, podané 19.12.1996, kde je jako FPT39 označena sloučenina "39.0", viz str. 95 WO 97/23478) léčit nádory a dále popisuje to, že kombinované terapie proti buňkám karcinomu prostaty a proti buňkám karcinomu prsu je účinnější než terapie každým lékem zvlášť.

Antiproliferativní účinnost rAd5/p53 a FPT39 proti SK-OV-3 ovariálnímu nádoru

Metody: SK-OV-3 lidské ovariální nádorové buňky (p53^{null}) byly umístěny do 96-jamkových ploten v hustotě 250 buněk na

jamku v Eaglově MEM + 10% fetální hovězí sérum. Buňky byly potom inkubovány při 37 °C a v 5% CO₂ po dobu 4 hodin. Do každé jamky se přidalo FPT39 nebo vehikulum a kultivace buněk pokračovala po dobu 3 dnů. Po třech dnech se neošetřené buňky v některých jamkách spočítaly pro stanovení množství rAd5/p53, které má být přidáno. Do každé jamky se potom přidal rAd5/p53 nebo vehikulum a kultivace buněk pokračovala po dalších dobu 3 dnů. Proliferace buněk se kvantifikovala za použití MTT testu. Stručně, 25 µl 5 mg/ml MTT vital barviva [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid] se přidalo do každé jamky a provedla se inkubace po dobu 3-4 hodin při 37 °C a v 5% CO₂. Potom se do každé jamky přidalo 100 µl 10% SDS detergentu a provedla se inkubace přes noc. Fluorescence v každé jamce se kvantifikovala za použití čtečky mikroploten (Molecular Devices). Data týkající se proliferace buněk byla analyzována za použití Thin Plate Spline statistické metody, kterou popsali O'Connell a Wolfinger (1997) J. Comp. Graph. Stat. 6: 224-241.

Výsledky: rAd5/p53 a FPT39 mají aditivní účinek v inhibici růstu buněk. V tomto pokusu nebyl prokázán ani synergismus ($p > 0,05$), ani antagonismus ($p > 0,05$).

Antiproliferativní a synergní účinnost rAd5/p53 a FPT39 (inhibitoru FPT) na Du-145 buňky karcinomu prostaty

Metody: DU-145 lidské buňky karcinomu prostaty (p53^{mut}) byly ošetřeny FPT39 nebo vehikulem a rAd5/p53 a buněčné kultury byly potom analyzovány způsobem pospaným výše pro SK-OV-3 lidské buňky karcinomu ovaria. Pokus byl opakován dvakrát.

29.10.99

Výsledky: Pokus 1: rAd5/p53 a FPT39 měly aditivní účinek v inhibici růstu buněk. V tomto pokusu nebyl prokázán ani synergismus ($p > 0,05$), ani antagonismus ($p > 0,05$).

Pokus 2: rAd5/p53 a FPT39 měly synergní účinek ($p = 0,0192$). Tyto výsledky ukazují, že rAd5/p53 a FPT39 mohou interagovat a mají synergistický účinek na proliferaci buněk karcinomu prostaty.

Antiproliferativní a synergní účinnost rAd5/p53 a FPT39 (inhibitoru FPT) na MDA-MB-231 buňky karcinomu prsu

Metody: MDA-MB-231 lidské buňky karcinomu prsu ($p53^{mut}$) byly ošetřeny FPT39 nebo vehikulem a rAd5/p53 a buněčné kultury byly potom analyzovány způsobem popsaným výše pro SK-OV-3 lidské buňky karcinomu ovaria. Pokus byl opakován dvakrát.

Výsledky: Pokus 1: rAd5/p53 a FPT39 měly aditivní účinek v inhibici růstu buněk. V tomto pokusu nebyl prokázán žádný synergismus ($p > 0,05$).

Pokus 2: rAd5/p53 a FPT39 měly aditivní účinek ve většině odpovědí. Nicméně, synergní účinek byl zjevný při isobolách vyšších nebo rovných 70 (t.j. méně než 30% usmrcených buněk, $p = 0,0001$). Tyto výsledky ukazují, že rAd5/p53 a FPT39 mohou interagovat a mají synergistický účinek na proliferaci buněk karcinomu prsu.

Příklad 7: Profil imunitní odpovědi u pacientů s metastasami karcinomu do jater léčených adenovirovým vektorem nesoucím p53

Vynález obsahuje způsob pro kombinované in vivo podání nukleové kyseliny exprimující p53 a jiného chemoterapeutického

činidla v léčbě nádorů. Následující příklad popisuje schopnost adenoviru exprimujícího p53 podle předkládaného vynálezu zvyšovat hladiny lymfocytů usmrcujících nádorové buňky, které jsou nacházeny v lidském karcinomu jater.

Cílem této studie byla charakterizace genotypů a fenotypů lymfocytů infiltrujících nádory (TIL) v metastasách karcinomu střeva nesoucího mutaci p53 do jater (pro diskusy o TIL viz např. Wang (1997) Mol. Med. 3: 716-731; Marrogi (1997) Int. J. Cancer 74: 492-501). Celkem 16 pacientů bylo léčeno zvyšující se dávkou 10^9 - 10^{11} částic adenovirového vektoru nesoucího přirozený p53 přes a. hepatica. 3 až 7 dní po podání adenovirového vektoru byly od každého pacienta získány celkem 4 biopsie. Imunohistochemické analýzy byly provedeny na zmrazené tkáni získané z normálních jater a z přechodné zony hostitel-nádor. Počítačová analýza byla provedena pro kvantifikaci imunoreaktivity následujících monoklonálních protilátek: CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD56, HLA-DR, IFN- γ , TNF- α a IL-2. Zvýšení populace TIL (CD3+ a CD4+) bylo pozorováno s maximem při $7,5 \times 10^{10}$ částic. Při vyšších dávkách bylo pozorováno snížení CD3+ a CD4+ populace. Inversní korelace byla pozorována pro CD8+ buňky. Při nejvyšší dávce ($2,5 \times 10^{11}$) bylo pozorováno zvýšení CD3+, CD4+ a CD8+ populace v nádorech ve srovnání s normální tkání. Tyto výsledky ukazují, že podání vysokých dávek adenovirových částic vede ke zvýšení TIL, které jsou složeny z CD4+ a CD8+ populace.

Mělo by být jasné, že příklady a provedení zde uvedené jsou pouze ilustrativní a že mohou být provedeny různé variace a modifikace těchto provedení, která spadají do rozsahu předkládaného vynálezu, jak je vymezen v připojených patentových nárocích. Všechny citované publikace, patenty a patentové přihlášky jsou zde uvedeny jako odkazy.

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Způsob ošetření savčích nádorových nebo hyperproliferativních buněk, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje kontaktování buněk uvedeného nádoru nebo uvedených hyperproliferativních buněk s tumor-supresorovou nukleovou kyselinou a také kontaktování uvedených buněk s činidlem působícím na mikrotubuly nebo inhibitorem polyprenyl-protein transferasy, kde uvedenou tumor-supresorovou nukleovou kyselinou je nukleová kyselina kodující tumor-supresorový protein zahrnující přirozený p53 protein nebo retinoblastomový (RB) protein.
2. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedeným činidlem působícím na mikrotubuly je paclitaxel, Taxol®, Taxotere® nebo derivát paclitaxelu.
3. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedeným inhibitorem polyprenyl-protein transferasy je inhibitor farnesyl-protein transferasy (FPT) nebo inhibitor geranyl-geranyl-protein transferasy.
4. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedeným inhibitorem farnesyl-protein transferasy (FPT) je FPT39, farnesylovaná peptidomimetická sloučenina, kondenzovaný tricyklický benzocykloheptapyridin nebo derivát farnesyly.
5. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále zahrnuje kontaktování buněk s chemoterapeutickým činidlem.
6. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedená nukleová kyselina je přepravena vektorem vybraným ze skupiny zahrnující holý DNA plasmid, plasmid v liposomu,

plasmid v komplexu s lipidem, virový vektor, AAV vektor a rekombinantní adenovirový vektor.

7. Způsob podle nároku 6 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným vektorem je A/C/N/53.

8. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že: uvedený tumor-supresorový protein nebo tumor-supresorová nukleová kyselina jsou podány v celkové dávce od přibližně 1×10^9 do přibližně $7,5 \times 10^{15}$ adenovirových částic ve schematu vybraném skupiny skládající se z: celkové dávky v jedné dávce, celkové dávky rozdělené do 5 dnů s podáním denně; celkové dávky rozdělené do 15 dnů s podáním denně; a celkové dávky rozdělené do 30 dnů s podáním denně; a

uvedený paclitaxel nebo derivát paclitaxelu je podán v celkové dávce v rozmezí od přibližně 75 do přibližně 350 mg/m² za 24 hodin v léčebném schematu vybraném ze skupiny skládající se z: jedné dávky, dávky podané denně v den 1 a v den 2; dávky podané denně v den 1, v den 2 a v den 3; denní podávání dávky po dobu 15 dnů; denní podávání dávky po dobu 30 dnů; kontinuální infuse po dobu 15 dnů; kontinuální infuse po dobu 30 dnů.

9. Farmaceutický prostředek v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje tumor-supresorovou nukleovou kyselinu a činidlo působící na mikrotubuly nebo inhibitor polyprenyl-protein transferasy, kde uvedenou tumor-supresorovou nukleovou kyselinou je nukleová kyselina kodující tumor-supresorový protein vybraný ze skupiny zahrnující přirozený p53 protein nebo retinoblastomový (RB) protein.

10. Farmaceutický prostředek podle nároku 9 v y z n a č u j í c í s e t í m, že:

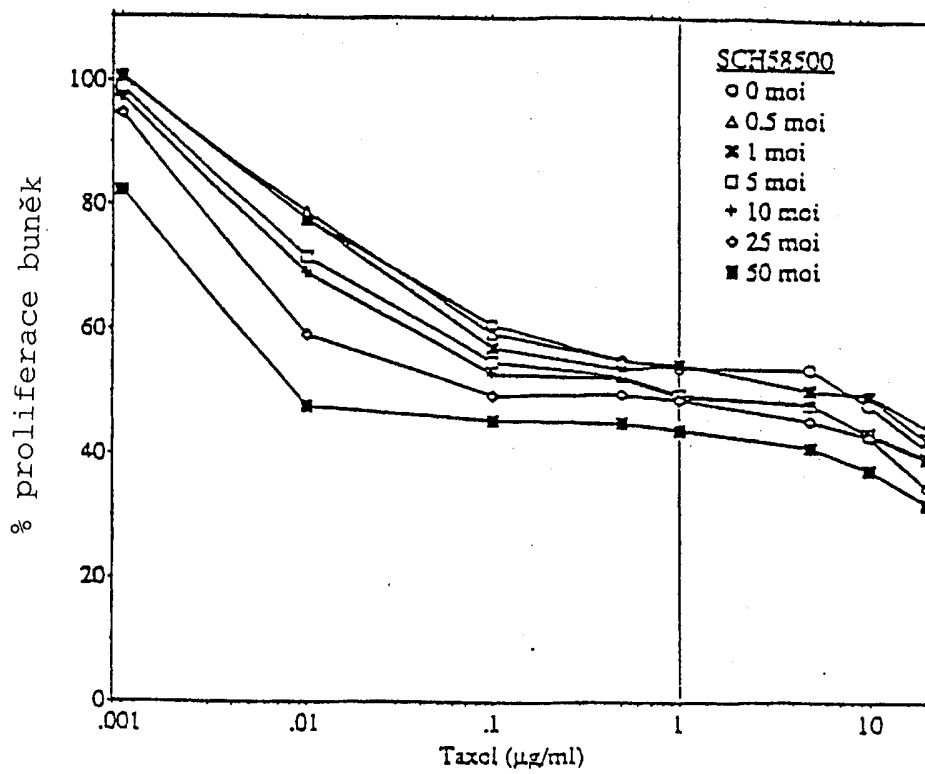
uvedeným činidlem působícím na mikrotubuly je paclitaxel, Taxol®, Taxotere® nebo derivát paclitaxelu; a

29.10.99

uvedeným inhibitorem polyprenyl-protein transferasy je inhibitor farnesyl-protein transferasy (FPT) nebo inhibitor geranyl-geranyl-protein transferasy.

1/13

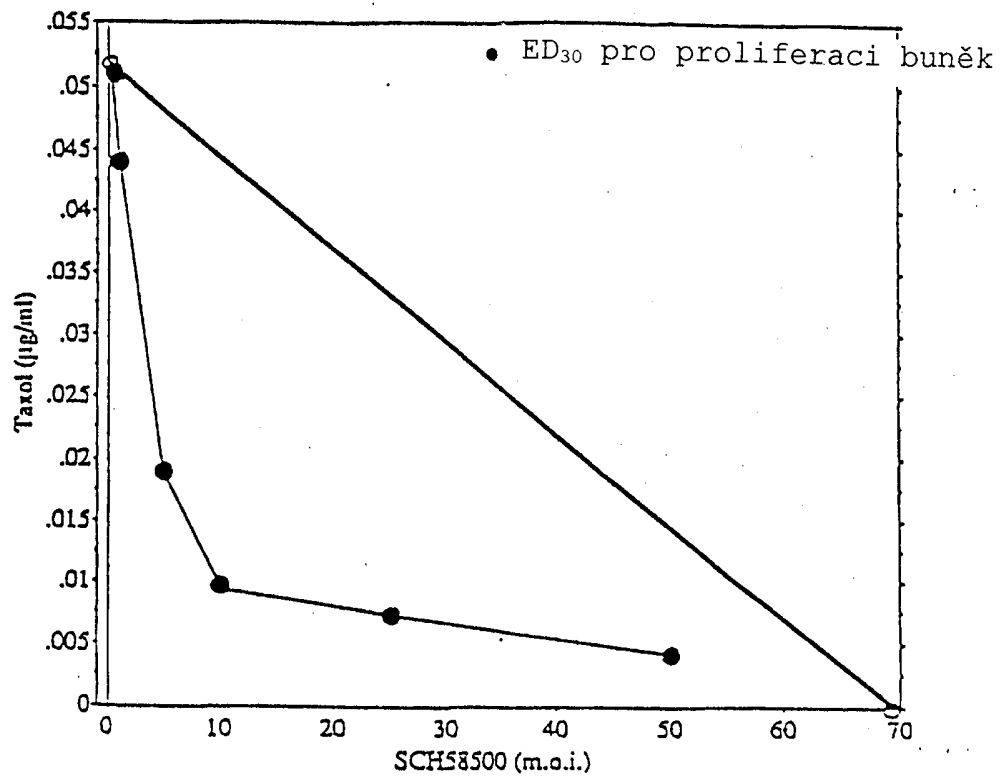
Obr. 1



29.10.99 PVK 93399

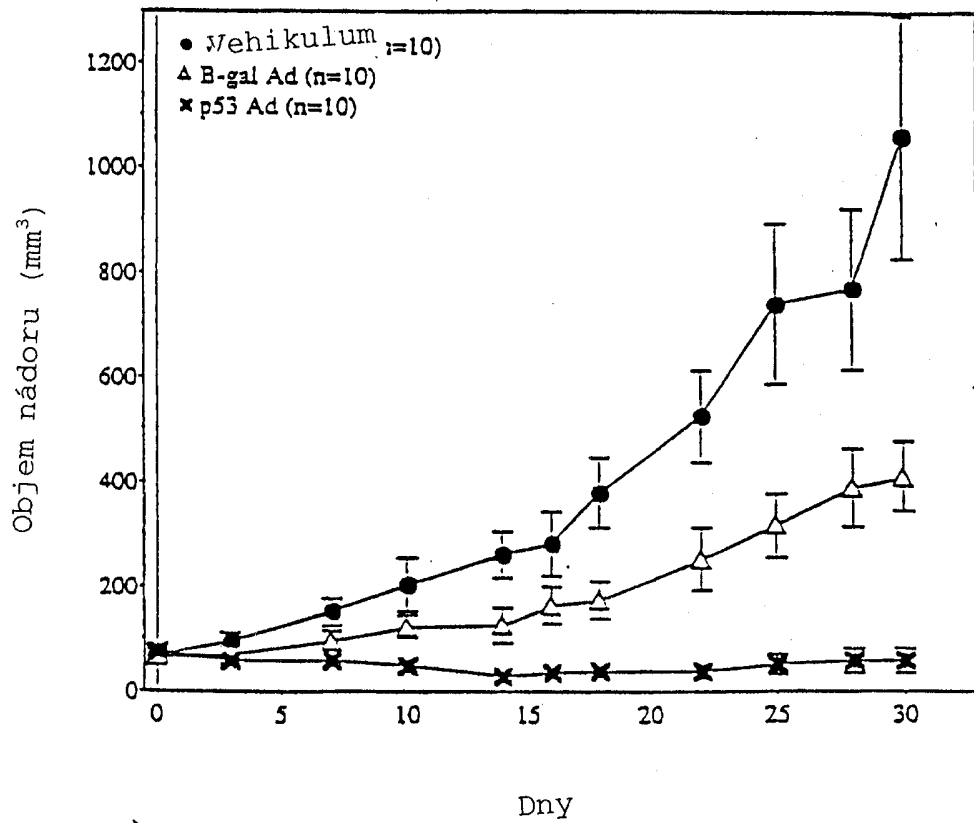
2/13

Obr. 2



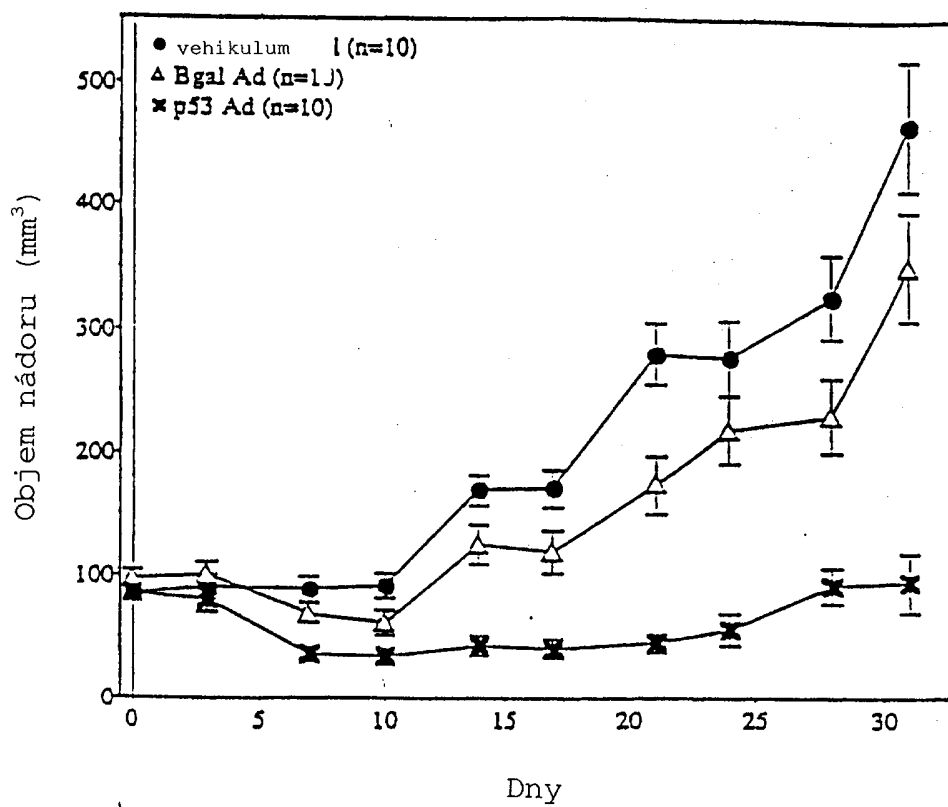
3/13

Obr. 3a



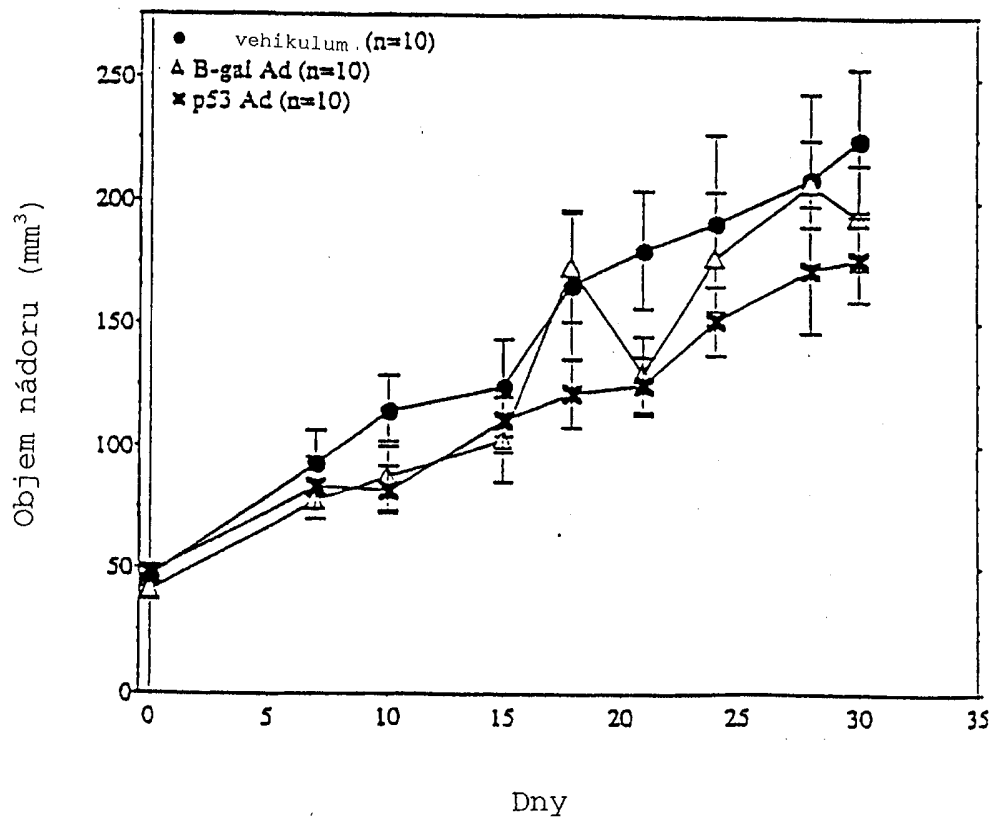
4/13

Obr. 3b



5/13

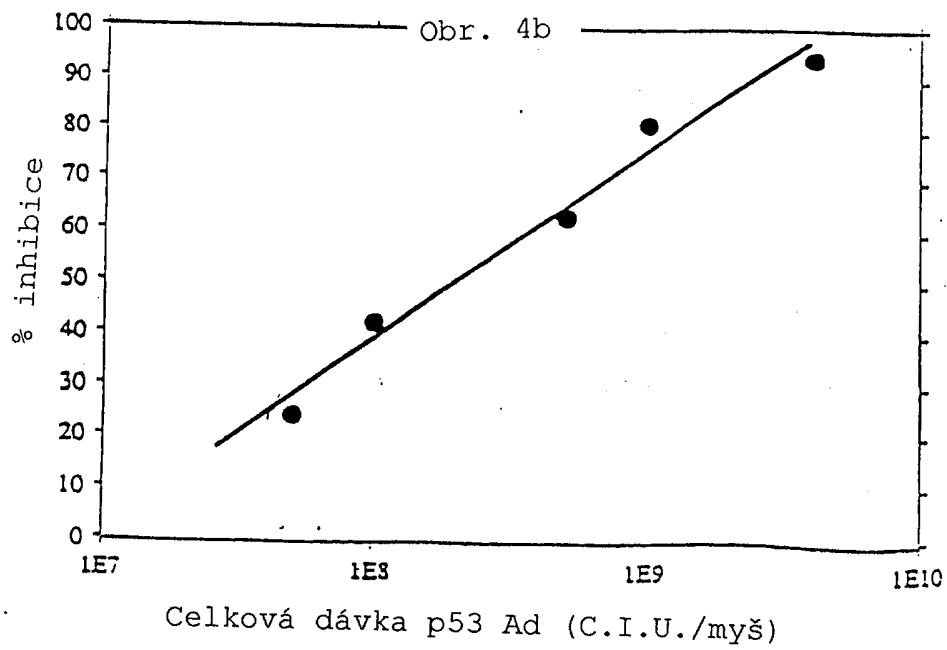
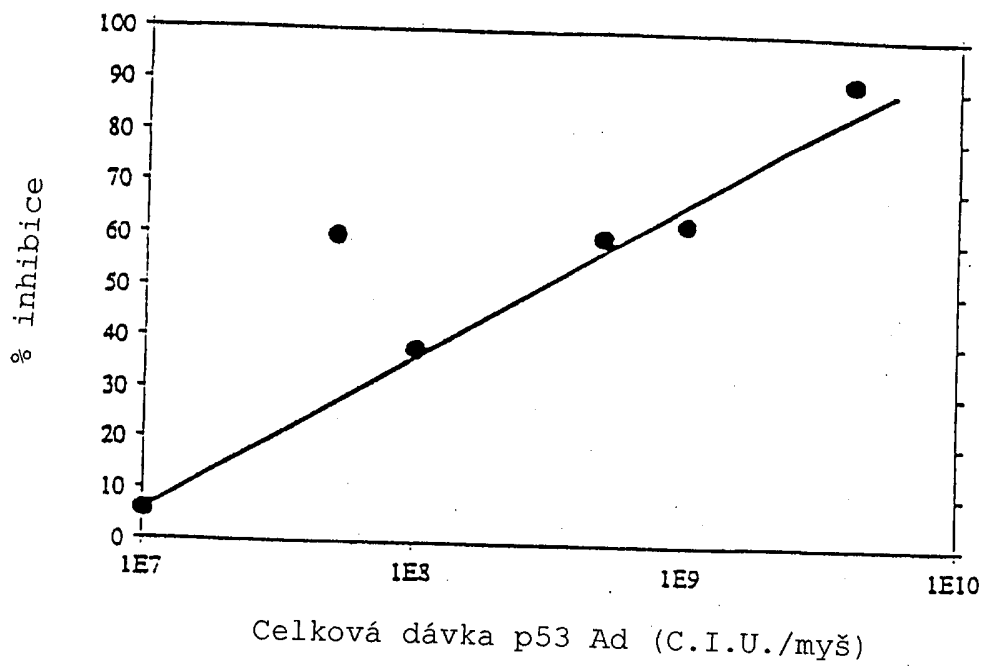
Obr. 3c



29.10.99 PV 1933-99

6/13

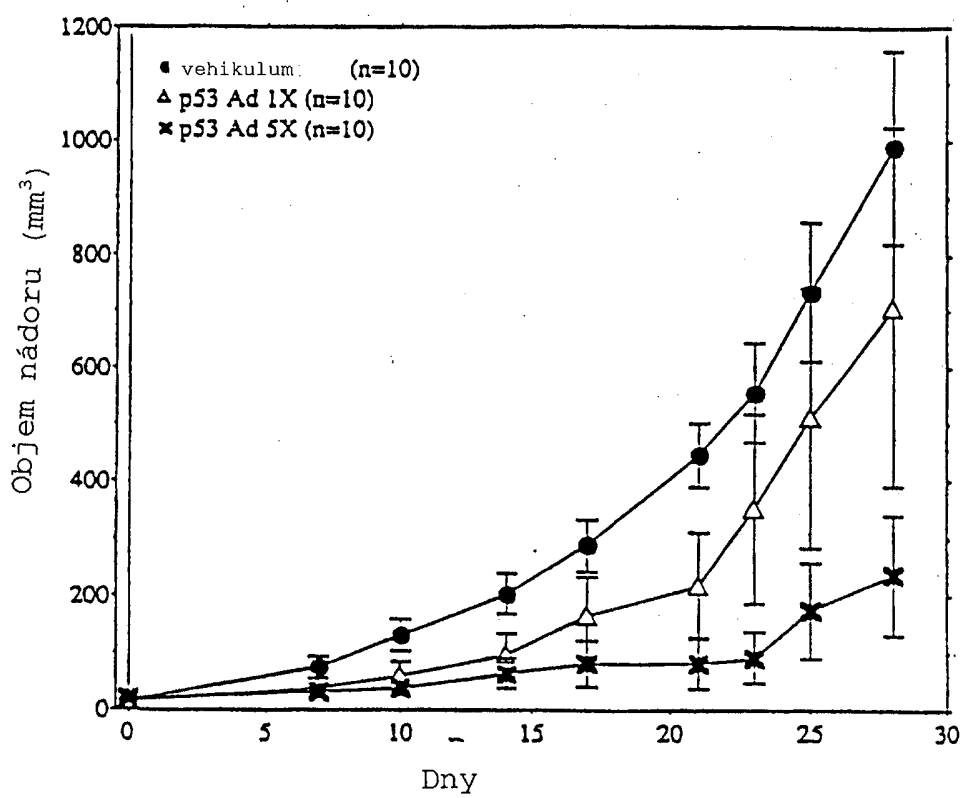
Obr. 4a



29.10.99 PV 2933-99

7/13

Obr. 5

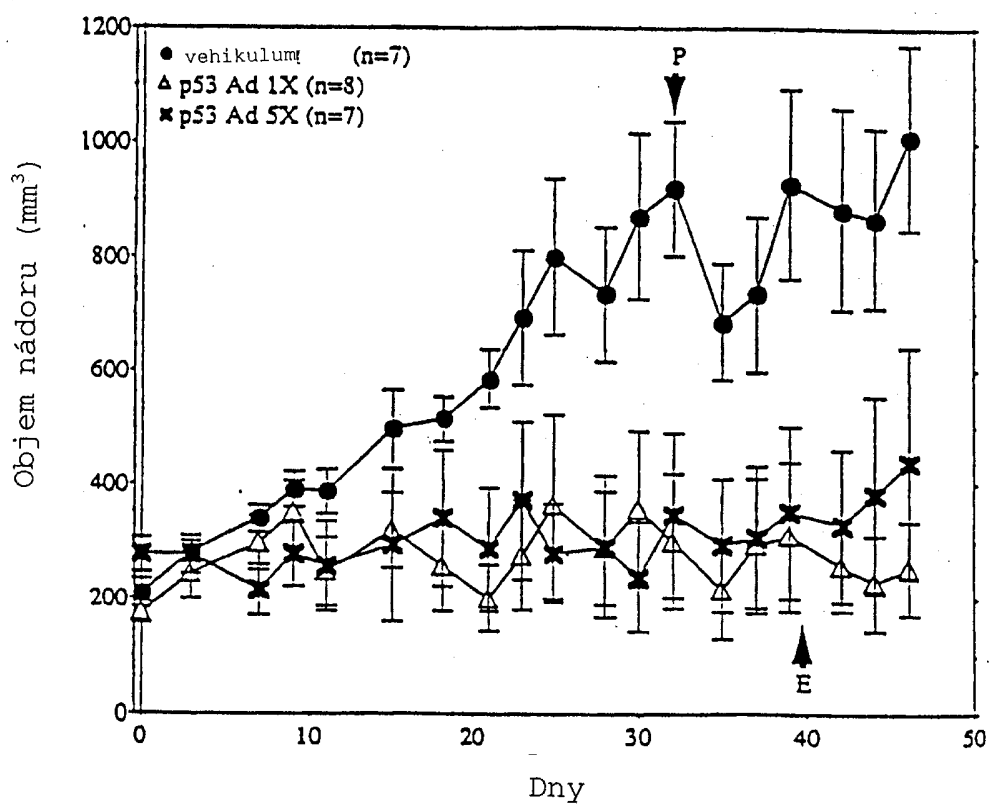


29.10.99

PVd933-99

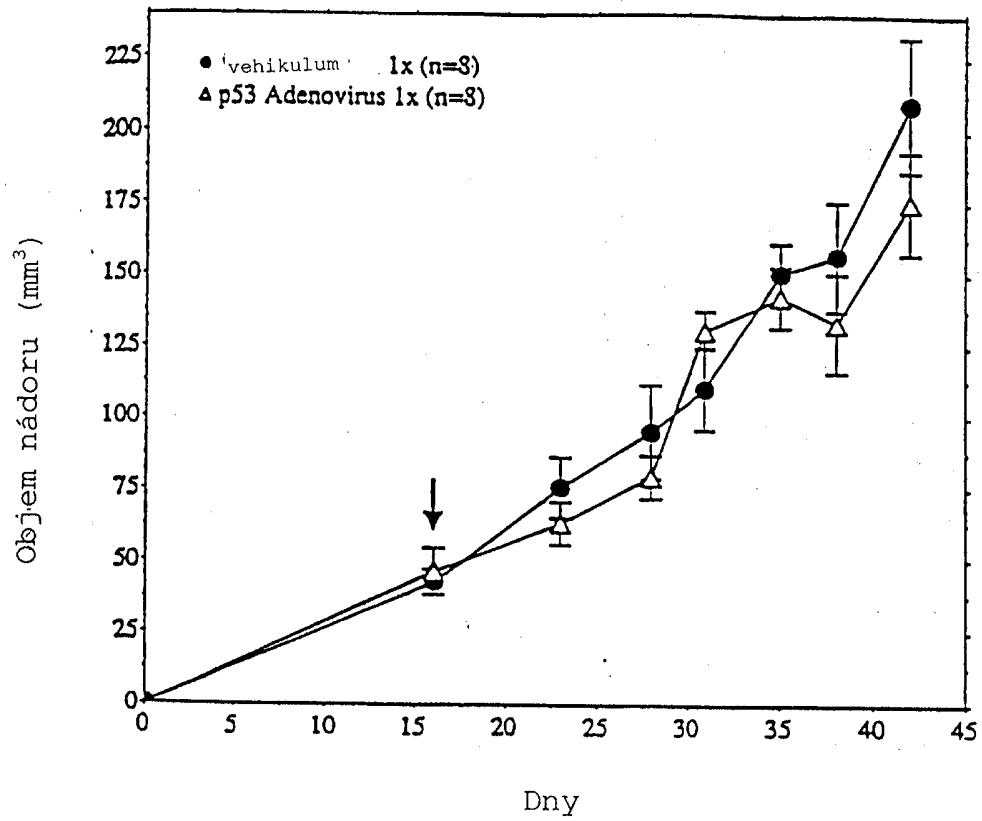
8/13

Obr. 6



9/13

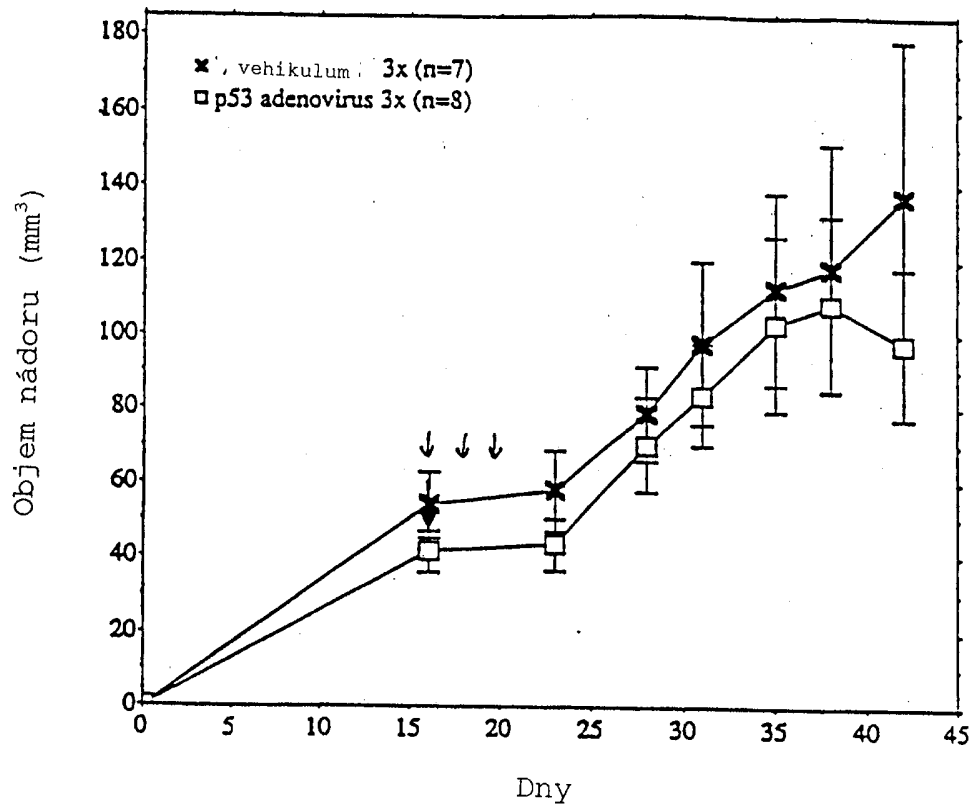
Obr. 7a



29.10.99 7/1033-99

10/13

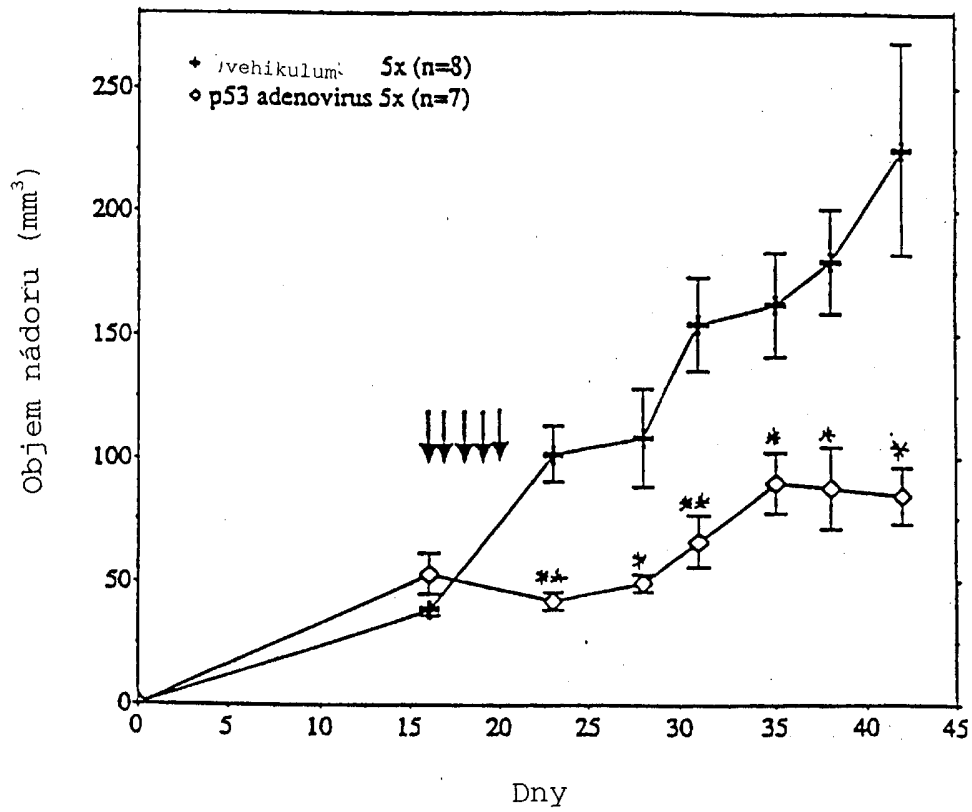
Obr. 7b



29.10.99 PV2933-99

11/13

Obr. 7c

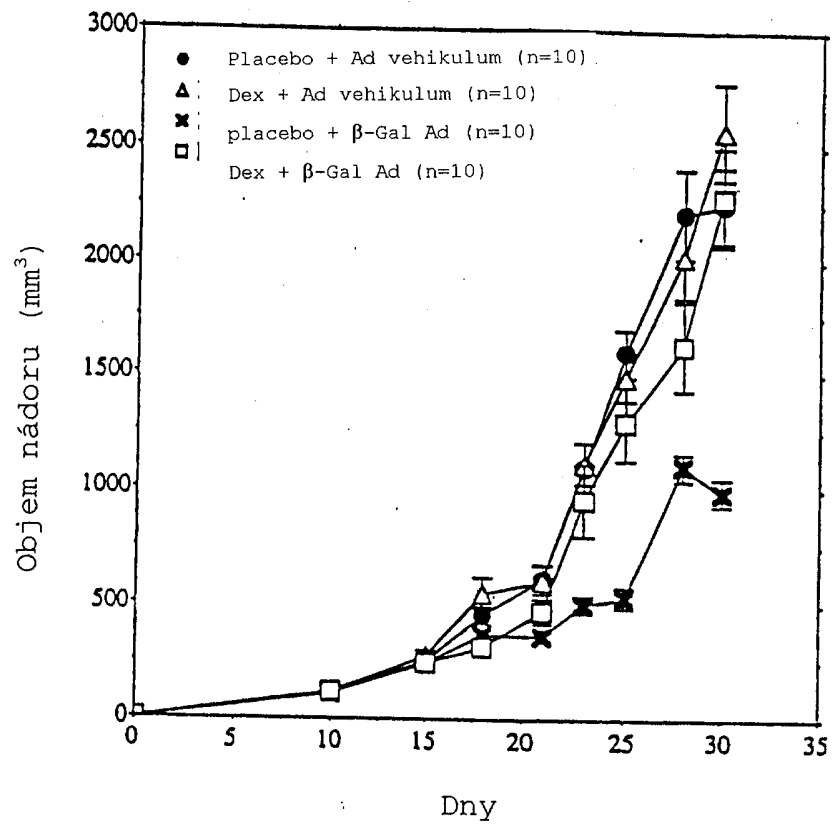


t Test
** $\bar{p} \leq 0.001$
* $\bar{p} \leq 0.01$

% Inhibition
 $\bar{x} = 55\%$

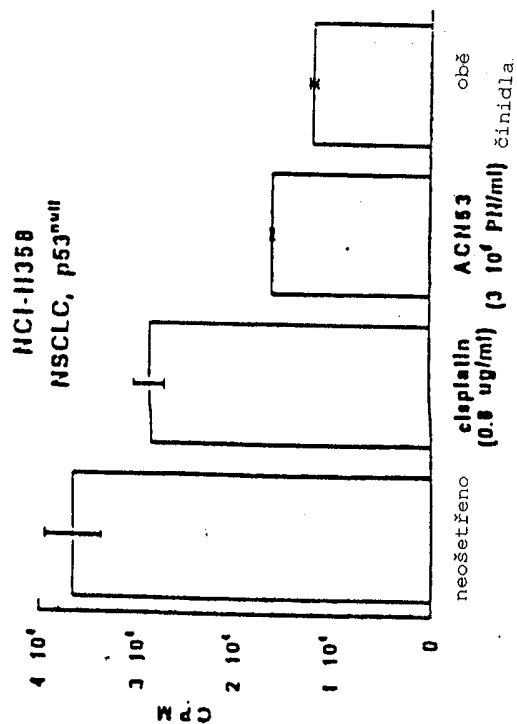
12/13

Obr. 8

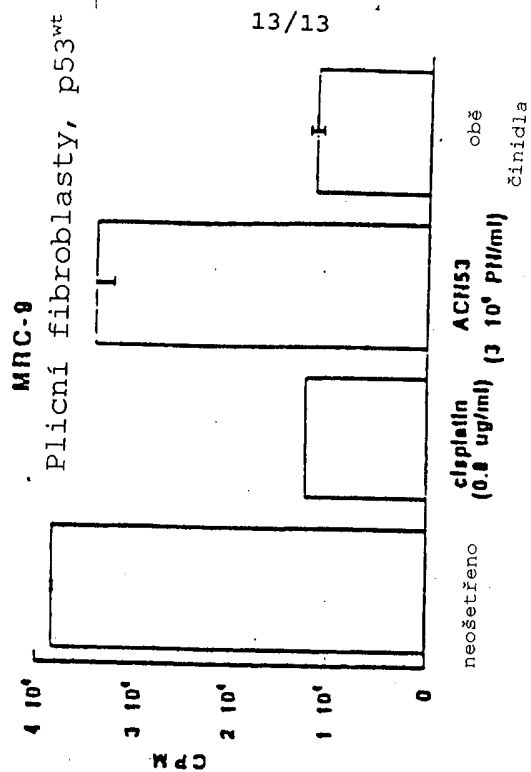


Nádorové vs Normální buňky

Obr. 9a



Obr. 9b



Normální diploidní fibroblasty, MRC-9, nevykazují zdůrazněný účinek.