PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

1657-98

(19)

ČESKÁ REPUBLIKA



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **27. 11. 96**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **30.11.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **95/007810**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16. 12. 97**
(Věstník č. 12/97)

(86) PCT číslo: **PCT/US96/19083**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/20047**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6]:
C 12 N 15/12
A 61 K 48/00

(71) Přihlášovatel:
BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM, Austin, TX, US;

(72) Původce:
Clayman Gary L., Houston, TX, US;

(74) Zástupce:
Jirotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Způsoby a přípravky pro diagnózu a léčbu rakoviny

(57) Anotace:
Způsoby pro léčbu spinocelulárního karcinomu za použití p53 expresního virového vektoru. V konkrétních provedeních je vektor replikace-deficientní adenovirus. Kromě toho jsou poskytnuty způsoby pro vyšetření vývoje a léčby mikroskopického zbytkového onemocnění v kontexu s prostředím po chirurgickém zákroku a tělních dutin.

CZ 1657-98 A3

22.07.98

PV 1657-98

~~307~~ 44770

Způsoby a přípravky pro diagnózu a léčbu rakoviny

Oblast techniky

Předkládaný vynález se obecně týká oblasti biologie nádorů. Přesněji se vynález týká kompozic a způsobů pro léčbu spinocelulárního karcinomu. Také je poskytnut zvířecí model pro vyšetření mikroskopických zbytkových nádorů a implantace nádoru do tělesných dutin, stejně jako způsoby pro léčbu nádoru.

Dosavadní stav techniky

Rovnováha mezi proliferací buněk a smrtí buněk je důležitá pro udržení homeostasy normální tkáně. Porušení této rovnováhy může být hlavním faktorem v mnohostupňovém procesu onkogenese a inhibice apoptosy, neboli programované buněčné smrti, je jednou z příčin tohoto porušení. Účinky takového defektu jsou katastrofální a způsobují více jak půl milionu úmrtí ročně jenom ve Spojených státech amerických.

Existují významné důkazy určující význam mutací p53 genu, "tumor supresivního" genu, v etiologii mnoha nádorů u lidí. Studie ukázaly, že růst několika různých lidských nádorových buněčných linií, včetně representativních nádorů tlustého střeva, glioblastomu, karcinomu prsu, osteosarkomu a karcinomu plic, může být funkčně potlačen virem zprostředkovaným přenosem přirozeného p53 genu. Indukce exogenní exprese p53 přirozeného p53 byla prokázána jako indukující apoptosu u buněčných linií karcinomu tlustého střeva a u sferoidů lidského karcinomu plic, což naznačuje roli p53 pro

programovanou buněčnou smrt.

Pacienti se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku (SCCHN) jsou postiženi onemocněním, které má často značné účinky na mluvu, polykání a kosmetický vzhled. Kromě toho, celkový stupeň přežití u těchto pacientů, asi 50%, se nezměnil po dobu posledních 30 let, kdy byla zavedena současná chirurgická a radiační terapie. Recidivy jsou především lokální a regionální než systemové, což naznačuje, že mikroskopický residuální karcinom v primárním místě nádoru je hlavní příčinou mortality. Vzhledem k těmto skutečnostem je schopnost účinně zaútočit na mikroskopickou zbytkovou nemoc u SCCHN snahou, která může zlepšit terapeutickou účinnost léčby nádorů.

Podstata vynálezu

Proto je předmětem předkládaného vynálezu poskytnutí vylepšených metod pro in vivo léčbu spinocelulárního karcinomu. Jiným předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí metody pro hodnocení a pro léčbu mikroskopického zbytkového karcinomu a mikroskopické disseminace nádoru v tělesných dutinách.

Při plnění těchto předmětů je zde poskytnuta metoda pro léčbu subjektů se spinocelulárním karcinomem, která obsahuje kroky (a) poskytnutí expresního konstruktu obsahujícího promotor funkční v eukaryotických buňkách a polynukleotid kodující p53, kde polynukleotid je umístěn "sense" k a pod kontrolou promotoru; a (b) provedení kontaktu expresního konstruktu se spinocelulárním karcinomem in vivo.

Spinocelulární karcinom může být karcinom hlavy a krku. Endogenní p53 u spinocelulárního karcinomu může nebo nemusí být mutován. Expresním konstruktem je preferovaně virový vektor, jako je retrovirový vektor, kde nejvíce je preferován adenovirový vektor s deficiencí replikace. V jednom určitém provedení je p53 gen upraven připojením sekvence tak, že exprese p53 z expresního vektoru může být detekována. Preferovanou připojenou sekvencí je imunologická sekvence, jako je kontinuální epitop protilátky.

Způsob dále obsahuje chirurgickou resekci nádoru, s poresekčním kontaktováním lůžka nádoru, nebo "arteficiální tělesné dutiny", s expresním konstruktem. Objem použitý pro kontaktování lůžka nádoru je asi 3 ml až asi 10 ml. Pokud je použit adenovirus, pak je množství adenoviru použité pro každé kontaktování asi 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11} nebo 10^{12} pfu.

Také je uvažována kontinuální perfuse expresního konstruktu. Množství konstruktu podané v kontinuální perfusi bude určeno z množství podaného injekčně tak, že je podána asi stejná celková dávka za stejnou dobu, ačkoliv za použití kontinuální perfuse může být dosažena o něco vyšší celková dávka.

V jiném provedení je expresní konstrukt injikován do přirozené tělesné dutiny jako jsou ústa, hltan, jícen, hrtan, průdušnice, pleurální dutina, peritoneální dutina nebo dutiny dutých orgánů jako je močový měchýř, tlusté střevo nebo jiné viscerální orgány.

Také je poskytnut způsob pro určení účinnosti léčby

mikroskopického zbytkového karcinomu, který obsahuje (a) poskytnutí hlodavce s incisí v podkožní tkáni; (b) umístění nádorových buněk do incise; (c) léčbu hlodavce terapeutickým režimem; a (d) hodnocení účinku režimu na vývoj nádorů. Incise může být uzavřena po kroku (b) a před krokem (c). Dále, režim může obsahovat zavedení terapeutické kompozice do incise, kdy incise je znova otevřena po uzavření a znovu uzavřena po zavedení terapeutické kompozice.

Jiné předměty, rysy a výhody předkládaného vynálezu budou zřejmé z následujícího podrobného popisu. Mělo by být nicméně jasné, že podrobný popis a jednotlivé příklady, ačkoliv ukazují preferovaná provedení vynálezu, jsou uvedeny pouze jako ilustrace, jelikož z tohoto podrobného popisu budou odborníkům zřejmé různé změny a modifikace spadající do rozsahu předkládaného vynálezu.

Popis obrázků na připojených výkresech

Následující obrázky tvoří část předkládané přihlášky a jsou zde uvedeny pro další demonstraci jistých aspektů předkládaného vynálezu. Vynález může být dále pochopen s odkazem na jeden nebo více z těchto obrázků v kombinaci s podrobným popisem specifických provedení zde uvedených:

Obrázek 1. Účinnost transdukce SCCHN buněčné linie Tu-138 (trojúhelníčky) a Tu 177 (čtverečky). Rekombinantní ß-Gal adenovirus byl použit pro infikování buněk v různém MOI v rozmazí 10 až 100. Procento ß-Gal pozitivních buněk bylo získáno z počítání 500 buněk na každé replikační plotně.

Obrázek 2A a 2B. Inhibice růstu SCCHN buněk in vitro. (Obrázek 2A) Růstová křivka falešně infikovaných Tu-138 buněk (kolečka), dl312-infikovaných buněk (trojúhelníčky) a Ad5CMV-p53-infikovaných buněk (čtverečky). (Obrázek 2B) Růstová křivka falešně infikovaných Tu-177 buněk (kolečka), dl312-infikovaných buněk (trojúhelníčky) a Ad5CMV-p53-infikovaných buněk (čtverečky). V každém ukázaném čase byly tři plotny buněk trypsinizovány a počítány. Průměr ± SEM počtu buněk ve třech jamkách po infekci je uveden ve grafu vzhledem k počtu dní od infekce.

Obrázek 3A, Obrázek 3B, Obrázek 3C a Obrázek 3D. Složená růstová křivka čtyř SCCHN buněčných linií. (Obrázek 3A) Tu-138. (Obrázek 3B) Tu-177. (Obrázek 3C) MDA 686-LN. (Obrázek 3D). MDA 886. Falešně infikované buňky (kolečka), dl312-infikované buňky (trojúhelníčky) a Ad5CMV-p53 infikované buňky (čtverečky). Průměr počtu buněk ve třech jamkách po infekci je uveden ve grafu vzhledem k počtu dní od infekce; sloupce, SEM.

Obrázek 4. Růstová křivka normální fibroblastové buněčné linie. Falešně infikované buňky (kolečka), dl312-infikované buňky (trojúhelníčky) a Ad5CMV-p53 infikované buňky (čtverečky).

Obrázek 5A, Obrázek 5B. Složená růstová křivka SCCHN buněčných linií. (Obrázek 5A) Tu-138. (Obrázek 5B) MDA 686-LN. Falešně infikované buňky (čtverečky), dl312-infikované buňky (trojúhelníčky) a Ad5CMV-p53 infikované buňky (kolečka). V každém ukázaném čase byly tři plotny buněk trypsinizovány a počítány.Průměr počtu buněk ve třech jamkách

22.07.98

po infekci je uveden ve grafu vzhledem k počtu dní od infekce; sloupce, SEM.

Obrázek 6A a Obrázek 6B. Značení DNA zlomů v apoptotických buňkách biotynylovaným dUTP TUNEL metodou. Po infekci byla provedena analýza průtokovou cytometrií na apoptosu vzhledem k času. Obrázek 6A. Tu-138 buňky, které jsou infikovány dl312, replikace-deficientním adenovirem (panel 1 - panel 4), Tu-138 buňky jsou infikovány adenovirem s přirozeným p53 (panel 5 - panel 8). Obrázek 6B. MDA686LN buňky, které jsou infikovány dl312, replikace deficientním adenovirem (A-D), MDA686LN buňky infikované adenovirem s přirozeným p53 (E-H). Ap znamená apoptosa.

Obrázek 7A a 7B. Složená růstová křivka SCCHN buněčné linie. Obrázek 7A: Tu-138; Obrázek 7B: MD686LN; Falešně infikované buňky (kolečka), dl312-infikované buňky (trojúhelníčky), Ad5CMV-p53-infikované buňky (prázdné čtverečky) a Ad5CMV-p53-FLAG infikované buňky (plné čtverečky). V každém ukázaném čase byly tři plotny buněk trypsinizovány a počítány. Průměr + SEM počtu buněk ve třech plotnách je uveden ve grafu vzhledem k počtu hodin od infekce; sloupce, SEM.

22.07.98

Dosud dostupné informace naznačují, že jedním z primárních nedostatků léčby SCCHN je neschopnost úplně eradikovat onemocnění v primárním místě nádoru, nebo v bezprostředně sousedních nebo regionálních tkáních. Proto je předkládaný vynález navržen tak, že poskytuje způsoby genové terapie, které umožňují kompletněji a účiněji léčit SCCHN, konkrétně ovlivněním mikroskopického zbytkového karcinomu. Tato metodologie může být použita samostatně nebo jako doplněk k běžnější léčbě jako je chemoterapie nebo radioterapie nebo chirurgický výkon. Kromě toho, při použití zvířecího modelu specificky navrženého pro mikroskopický zbytkový karcinom, stejně jako pro mikroskopický rozsev nádoru do tělesných dutin, demonstroval předkladatel tohoto vynálezu účinnost těchto metod. Podrobnosti vynálezu jsou detailně uvedeny dále.

Obecně bylo nyní pozorováno, že genová terapie nádorů genem p53 může být účinná bez ohledu na p53 stav nádorových buněk. Překvapivě byly terapeutické účinky pozorovány tehdy, když byl virový vektor nesoucí přirozený p53 gen použit při léčbě nádoru, jehož buňky exprimovaly funkční p53 molekulu. Tento výsledek nebyl předpokládán na základě současných znalostí o funkci tumor-supresorních genů. Je to překvapivé také proto, že normální buňky, které také exprimují funkční p53 molekulu, jsou zjevně nenarušeny expresí vysokých hladin p53 z virového konstruktu. To vede k možnosti, že p53 genová terapie může být aplikovatelná na léčbu nádorů ve větším rozsahu, než bylo dříve předpokládáno.

A. p53 proteiny a polynukleotidy

V této přihlášce je termín "p53" míněn tak, že označuje

23.07.98

příklady doložené p53 molekuly stejně jako p53 homology z jiných druhů. "Přirozený" a "mutantní" p53 označují, v příslušném pořadí, p53 gen vykazující normální tumor supresorovou aktivitu a p53 gen postrádající nebo mající redukovanou supresorovou aktivitu a/nebo mající transformační aktivitu. Tak "mutantní" p53 nejsou pouze varianty sekvence, ale jsou to spíše varianty mající pozměněné funkční profily.

p53 je nyní znám jako tumor supresorový gen (Montenarh, 1992). Jeho vysoké hladiny byly nalezeny v mnoha buňkách transformovaných chemickou karcinogenesí, ultrafialovým zářením, a několika viry, včetně SV40. p53 gen je častým cílem mutační inaktivace v široké škále lidských nádorů a je již dokumentováno, že to je nejčastěji mutovaný gen u běžných lidských karcinomů (Mercer, 1992). Je mutován u více než 50% lidských NSCLC (Hollestein et al., 1991) a v široké škále jiných nádorů.

Ačkoliv nádory obsahující mutovaný p53 gen jsou preferovaným cílem podle předkládaného vynálezu, je použitelnost nárokovaných p53 expresních vektorů rozšířena na léčbu nádorů majících přirozený nebo funkční p53. Ačkoliv mechanismus není plně poznán, určili předkladatelé tohoto vynálezu, že p53 exprese může omezovat růst nádorů exprimujících funkční p53 produkt, a že může i indukovat apoptosu v takových buňkách. Tak není p53 stav nádoru, ačkoliv je potenciálně užitečný v diagnostickém kontextu, zásadní pro provádění předkládaného vynálezu. Tento fenomen není omezen na SCCHN nádory, ale může být aplikován na širokou škálu malignit včetně gliomů, sarkomů, karcinomů, leukemií, lymfomů a melanomu, včetně nádorů kůže, jater, varlat, kostí, mozku,

slinivky břišní, hlavy a krku, žaludku, jater, plic, vaječníků, prsu, tlustého střeva, prostaty a močového měchýře.

p53 polypeptidy

p53 gen koduje fosfoprotein o 375 aminokyselinách, který může vytvářet komplexy s virovými proteiny jako je velký T antigen a E1B. Protein je nacházen v normálních tkáních a buňkách, ale v koncentracích, které jsou minimální ve srovnání s mnoha transformovanými buňkami nebo nádorovými tkáněmi. Zajímavé je, že přirozený p53 se zdá být významným v regulaci buněčného růstu a dělení. Nadměrná exprese přirozeného p53 byla v některých případech ukázána jako antiproliferativní v lidských nádorových buněčných liniích. Tak může p53 účinkovat jako negativní regulátor buněčného růstu (Weinberg, 1991) a může přímo potlačovat nekontrolovatelný buněčný růst nebo nepřímo aktivovat geny, které potlačují tento růst. Tak může absence nebo inaktivace přirozeného p53 zapříčinit transformaci. Nicméně, některé studie ukazují, že přítomnost mutantního p53 může být nezbytná pro plnou expresi transformačního potenciálu genu.

Zatímco je přirozený p53 znám jako růstový regulátor zásadního významu v mnoha typech buněk, zdá se, že jeho genetické a biochemické znaky mají určitou roli. Mutace s chybným smyslem jsou běžné v p53 genu a jsou zásadní pro transformační schopnost onkogenu. Jediná genetická změna způsobená bodovou mutací může způsobit vznik karcinogeního p53. Oproti jiným onkogenům je nicméně známo, že bodové mutace v p53 se mohou vyskytnout v alespoň 30 odlišných kodonech, často za vytvoření dominantních alel, které produkují posun

22.07.98

v buněčném fenotypu bez redukce homozygotnosti. Kromě toho se zdá, že mnoho z těchto dominantních negativních alel je tolerováno v organismu a prochází do zárodečných linií. Různé mutantní alely jsou v rozsahu od minimálně dysfunkčních až do silně penetrantních, dominantních negativních alel (Weinberg, 1991).

Casey a kolegové popsali, že transfekce DNA kodující přirozený p53 do dvou lidských buněčných linií nádoru prsu obnovuje kontrolu suprese růstu v takových buňkách (Casey et al., 1991). Podobný účinek byl také prokázán na transfekci přirozeného, ale ne mutantního, p53 do lidských buněčných linií karcinomu plic (Takahasi et al., 1992). p53 přirozeného typu se zdá být dominantní nad mutantním genem a bude selektovat proti proliferaci, když bude transfektován do buněk s mutantním genem. Exprese transfektovaného p53 neovlivňuje růst normálních buněk s endogenním p53. Tak může být takový konstrukt vychytáván normálními buňkami bez nežádoucích účinků.

Je proto možné, že léčba karcinomů asociovaných s p53 přirozeným p53 může redukovat počet maligních buněk. Nicméně, studie, jaké jsou popsány výše, jsou daleko od dosažení takového cíle, v nemalé míře proto, že DNA transfekce nemůže být použita pro zavedení DNA do nádorových buněk v těle pacienta.

p53-kodující polynukleotidy

Polynukleotidy podle předkládaného vynálezu mohou kodovat celý p53 gen, funkční p53 proteinovou doménu, nebo jakýkoliv

p53 polypeptid. "Komplementární" polynukleotidy jsou ty, které jsou schopné párování bazí podle standartních Watson-Crickových pravidel komplementarity. To znamená, že větší puriny se budou párovat s menšími pyrimidiny za vzniku kombinací guaninu spárovaného s cytosinem (G:C) a adeninu spárovaného s buď thyminem (A:T) v případě DNA, nebo s adeninem spárovaným s uracilem (A:U) v případě RNA. Zahrnutí méně běžných bazí jako je inosin, 5-methylcytosin, 6-methyladenin, hypoxantin a jiných do hybridizující sekvence neinterferuje s párováním.

Jak je zde použito znamená "komplementární sekvence" polynukleotidové sekvence, které jsou významně komplementární v celé své délce a které mají velmi málo chybných spárování bazí. Například, sekvence o délce 15 bazí mohou být nazvány komplementárními, pokud mají komplementární nukleotidy v třinácti nebo ve čtrnácti pozicích. Přirozeně, sekvence, které jsou plně "komplementární" budou zcela komplementární v celé své délce a nebudou mít žádná chybná spárování bazí.

Také jsou uvažovány jiné sekvence s menším stupněm homologie. Například, může být navržen antisense konstrukt, který má omezené regiony vysoké homologie, ale také obsahuje nehomologní regiony (např. ribozym). Tyto molekuly se budou vázat na cílové sekvence za vhodných podmínek, ačkoliv mají méně než 50% homologii.

Polynukleotidy mohou být odvozeny od genomové DNA, t.j. mohou být klonovány přímo z genomu určitého organismu. V jiném provedení, nicméně, mohou být polynukleotidy komplementární DNA (cDNA). cDNA je DNA připravená za použití "messenger RNA"

mRNA templátu. Tak neobsahuje cDNA žádné přerušené kodující sekvence a obvykle obsahuje téměř výlučně kodující regiony pro odpovídající protein. V jiných provedeních může být polynukleotid produkován synteticky.

Může být výhodné kombinovat části genomové DNA s cDNA nebo se syntetickými sekvencemi pro vytvoření specifických konstruktů. Například, pokud je v konečném konstruktu žádoucí intron, pak je potřeba použít genomový klon. Introny mohou být odvozeny od jiných genů kromě p53. cDNA nebo syntetické polynukleotidy mohou dodat vhodnější restrikční místa pro zbývající část konstruktu, a proto by měly být použity pro zbytek sekvence.

Lidská a myší DNA sekvence pro p53 je dána v SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3, v příslušném pořadí, kdy odpovídající aminokyseliny jsou uvedeny v SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4, v příslušném pořadí.

Předpokládá se, že existují přirozené varianty p53, které mají sekvence odlišné od těch, které jsou zde popsány. Tak není předkládaný vynález omezen na použití poskytnuté polynukleotidové sekvence pro p53, alle spíše zahrnuje použití jakékoliv přirozené varianty. Předkládaný vynález také obsahuje chemicky syntetizované mutanty těchto sekvencí.

Jiný typ variant sekvence vychází z variace kodonů. Protože existuje několik kodonů pro většinu z 20 normálních aminokyselin, může mnoho různých DNA kodovat p53. Následující tabulka umožní identifikaci takových variant.

Tabulka 1

Aminokyseliny			Kodony					
Alanin	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cystein	Cys	C	UGC	UGU				
Kyselina aspartová	Asp	D	GAC	GAU				
Kyselina glutamová	Glu	E	GAA	GAG				
Fenylalanin	Phe	F	UUC	UUU				
Glycin	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidin	His	H	CAC	CAU				
Isoleucin	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Lysin	Lys	K	AAA	AAG				
Leucin	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Methionin	Met	M	AUG					
Asparagin	Asn	N	AAC	AAU				
Prolin	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Glutamin	Gln	Q	CAA	CAG				
Arginin	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serin	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Threonin	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valin	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
Tryptofan	Trp	W	UGG					
Tyrosin	Tyr	Y	UAC	UAU				

Když je brána v úvahu degenerace genetického kodu, jsou preferovány sekvence, které mají asi mezi 50% a asi 75%, nebo mezi 76% a 99% nukleotidů, které jsou identické s nukleotidy zde popsanými. Sekvence, které spadají do rozsahu "p53-kodujících

polynukleotidů" jsou ty, které jsou schopné párování bazí s polynukleotidovým segmentem popsaným výše za intracelulárních podmínek.

Jak bylo uvedeno výše, může být p53 kodující sekvence zcela genomová nebo cDNA kopie, nebo jejich větší fragmenty. Předkládaný vynález může také využít kratší oligonukleotidy p53. Sekvence o 17 bazích délky by se měly vyskytovat v lidském genomu pouze jednou a proto jsou dostačující pro specifikaci jedinečné cílové sekvence. Ačkoliv je snazší vyrobit kratší oligomery, které zvyšují in vivo dostupnost, v určování specificity párování bazí je zahrnuto mnoho jiných faktorů. Jak vazebná afinita, tak specificita sekvence oligonukleotidu vzhledem ke komplementárnímu cíli se zvyšují se zvyšující se délkou. Předpokládá se, že oligonukleotidy o 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 nebo 20 párech bazí jsou použitelné například při přípravě p53 mutantů a v PCR reakích.

Jakákoliv sekvence o 17 bazích délky by se měla vyskytovat pouze jednou v lidském genomu, a proto je dostatečná pro specifikaci jedinečné cílové sekvence. Ačkoliv je snazší vyrobit kratší oligomery, které zvyšují in vivo dostupnost, v určování specificity párování bazí je zahrnuto mnoho jiných faktorů. Jak vazebná afinita, tak specificita sekvence oligonukleotidu vzhledem ke komplementárnímu cíli se zvyšují se zvyšující se délkou.

V určitých provedeních může být žádoucí využít konstrukt, který bude obsahovat jiné elementy, například ty, které obsahují C-5 propinové pyrimidiny. Oligonukleotidy, které obsahují C-5 propinové analogy uridinu a cytidinu se váží na RNA s vysokou afinitou (Wagner et al., 1993).

Odborníkům v oboru je také dobře znám, na základě definice biologicky funkčně ekvivalentního proteinu nebo peptidu, koncept, že existuje limit počtu změn, které mohou být provedeny v definované části molekuly a stále ještě vedou ke vzniku molekuly s přijatelnou hladinou biologicky ekvivalentní aktivity. Biologicky funkčně ekvivalentní peptidy jsou zde proto definovány jako ty peptidy, ve kterých určité, ale ne většina nebo všechny aminokyseliny mohou být substituovány. Konkrétně, pokud je brán v úvahu N-konec p16 proteinu, pak se předpokládá, že pouze 16, nebo lépe poze asi 5 aminokyselin může být změněno v daném peptidu. Samozřejmě, množství různých proteinů/peptidů s různými substitucemi může být snadno vyrobeno a použito v souladu s předkládaným vynálezem.

Aminokyselinové substituce jsou obecně založeny na relativní podobnosti postraních řetězců aminokyselinových substituentů, například jejich hydrofobnosti, hydrofilnosti, náboji, velikosti, a podobně. Analýza velikosti, tvaru a typu postraních řetězců aminokyselinových substituentů ukazuje, že arginin, lysin a histidin jsou všechny zbytky s pozitivním nábojem; že alanin, glycin a serin jsou všechny podobné velikosti; a že fenylalanin, tryptofan a tyrosin mají všechny obecně podobný tvar. Proto, na základě těchto úvah, arginin, lysin a histidin; alanin, glycin a serin; a fenylalanin, tryptofan a tyrosin jsou zde definovány jako biologicky funkční ekvivalenty.

Při vytváření změn musí být brán v úvahu hydropatický index aminokyselin. Každé aminokyselině byl přiřazen hydropatický index na základě jejich charakteristik hydrofobicity a náboje: isoleucin (+4,5); valin (+4,2); leucin (+3,8); fenylalanin

(+2,8); cystein/cystin (+2,5); methionin (+1,9); alanin (+1,8); glycin (-0,4); threonin (-0,7); serin (-0,8); tryptofan (-0,9); tyrosin (-1,3); prolin (-1,6); histidin (-3,2); glutamat (-3,5); glutamin (-3,5); aspartat (-3,5); asparagin (-3,5); lysin (-3,9); a arginin (-4,5).

Význam hydropatického indexu aminokyselin pro určování interaktivních biologických funkcí proteinu je v oboru obecně známý (Kyte and Doolittle, 1982, zde uvedeno jako odkaz). Je známo, že jisté aminokyseliny mohou být substituovány za jiné aminokyseliny mající podobný hydropatický index nebo skore a přitom stále zůstává podobná biologická aktivita. Při vytváření změn založených na hydropatickém indexu je preferována substituce aminokyselin, jejichž hydropatické indexy jsou v rozmezí ± 2, a zejména je preferováno rozmezí ± 1, a ještě více je preferováno rozmezí ± 0,5.

Je známo, že aminokyselina může být substituována za jinou mající podobnou hodnotu hydrofobicity a stále může být získán biologicky ekvivalentní protein. Jak je podrobně uvedeno v U.S. patentu č. 4554101, následující hodnoty hydrofobicity byly přiřazeny aminokyselinovým zbytkům: arginin (+3,0); lysin (+3,0); aspartat (+3,0 ± 1); glutamat (+3,0 ± 1); serin (+0,3); asparagin (+0,2); glutamin (+0,2); glycin (0); threonin (-0,4); prolin (-0,5 ± 1); alanin (-0,5); histidin (-0,5); cystein (-1,0); methionin (-1,3); valin -1,5); leucin (-1,8); isoleucin (-1,8); tyrosin (-2,3); fenylalanin (-2,5); tryptofan (-3,4).

Při vytváření změn založených na podobných hodnotách hydrofilnosti jsou preferovány substituce aminokyselin, které

mají hodnoty hydrofilnosti v rozmezí ± 2, zejména jsou preferovány ty s hodnotami ± 1 a ještě více jsou preferovány ty s hodnotami ± 0,5.

B. Expresní vektory

V této přihlášce je termín "expresní konstrukt" míněn tak, že zahrnuje jakýkoliv typ genetického konstruktu obsahujícího nukleové kyseliny kodující genový produkt, ve kterém je část nebo celá kodující sekvence nukleové kyseliny schopná transkripce. Transkript může, ale nemusí, být translatován na protein. Tak v určitých provedeních, exprese zahrnuje jak transkripci p53 genu, tak translaci p53 mRNA na p53 proteinový produkt. V jiných provedeních, exprese pouze obsahuje transkripci nukleové kyseliny kodující p53 nebo jeho komplement.

Aby konstrukt způsoboval expresi alespoň p53 transkriptu, je polynukleotid kodující p53 polynukleotid pod transkripční kontrolou promotoru. "Promotor" označuje DNA sekvenci rozpoznávanou mechanismem syntesy hostitelské buňky, která je nutná pro iniciaci specifické transkripce genu. Fraze "pod transkripční kontrolou" znamená, že promotor je ve správném umístění ve vztahu k polynukleotidu kontrolujícímu iniciaci RNA polymerasy a expresi polynukleotidu.

Termín promotor zde bude používán tak, aby označoval skupinu modulů pro kontrolu transkripce, které jsou seskupeny okolo iniciačního místa pro RNA polymerasu II. Většina úvah o tom, jak jsou promotory organizovány, se odvíjí od analýz několika virových promotorů, jako jsou například promotory pro

22.07.98

HSV thymidin kinasu (tk) a SV40 časnou transkripční jednotku. Tyto studie, posílené novějšími pracemi, ukázaly, že promotory jsou složeny z odděelených funkčních modulů, kde každý se skládá z asi 7 - 20 bp DNA, a obsahují jedno nebo více míst pro transkripční aktivátor nebo pro represorový protein.

Alespoň jeden modul v každém promotoru působí na umístění startovacího místa pro syntesu RNA. Nejlepším známým příkladem je TATA box, ale v některých promotorech nemajících TATA box, jako je promotor pro savčí gen pro terminální deoxynukleotidyl transferasu a promotor pro SV40 pozdní geny, jeden element zahrnující startovací místo sám o sobě napomáhá fixovat místo iniciace.

Další promotorové elementy regulují frekvenci iniciace transkripce. Typicky jsou tyto umístěny v regionu 30 - 110 bp upstream od startovacího místa, ačkoliv nedávno bylo ukázáno, že mnoho promotorů obsahuje funkční elementy také downstream od startovacího místa. Mezera mezi promotorovými elementy je často flexibilní, takže funkce promotoru je zachována, pokud jsou elementy invertovány nebo posunuty ve vztahu jeden k druhému. V tk promotoru může být mezera mezi promotorovými elementy zvýšena až na 50 bp, než se začne aktivita snižovat. V závislosti na promotoru se zdá, že jednotlivé elementy mohou způsobovat aktivaci transkripce buď kooperativně, nebo nezávisle.

Typ promotoru, který je použit pro kontrolu exprese p53 polynukleotidu není zásadní, pokud je schopen exprimování polynukleotidu v cílových buňkách v dostatečných hladinách. Tak, kde je cílovou buňkou lidská buňka, tam je preferováno

22.07.98

umístění polynukleotidového kodujícího regionu do sousedství a pod kontrolu promotoru, který je schopen exprese v lidských buňkách. Obecně řečeno, takový promotor může být buď lidský, nebo virový promotor.

V různých provedeních může být použit promotor okamžitého časného genu lidského cytomegaloviru (CMV), SV40 časný promotor a dlouhý terminální opakující se úsek viru Rous sarkomu, pro získání vysoké hladiny exprese p53 polynukleotidu. Stejně tak se předpokládá použití jiných virových nebo savčích buněčných nebo bakteriálních promotorů, které jsou v oboru dobře známy, pro dosažení exprese polynukleotidů, s tou podmínkou, že hladiny exprese jsou dostatečné pro produkci inhibice růstu.

Za použití promotoru s dobře známými vlastnostmi může být optimalizována úroveň a charakter exprese polynukleotidu po transfekci. Například, selekce promotoru, který je aktivní ve specifických buňkách, jako je tyrosinasový (melanom), alfa-fetoprotein a albumin (jaterní nádory), CC10 (plicní nádory) a prostatický specifický antigen (nádory prostaty), umožní tkáňově specifickou expresi p53 polynukleotidů. Tabulka 2 uvádí několik promotorů/elementů, které mohou být použity v souladu s předkládaným vynálezem, pro regulaci exprese p53 konstruktů. Tento seznam není vyčerpávající ve smyslu uvedení všech možných elementů obsažených v navození exprese p53, ale je míněn spíše jako příklad.

Enhancery byly původně detekovány jako genetické elementy, které zvyšují transkripci z promotoru umístěného na vzdálenější pozici na stejné molekule DNA. Tato schopnost

22.07.98

účinkující na větší vzdálenost měla málo precedentů v klasických studiích regulace transkripce u prokaryotických organismů. Další práce ukázaly, že regiony DNA s aktivitou enhacerů jsou organizovány podobně jako promotory. To znamená, že jsou složeny z mnoha jednotlivých elementů, kde každý z nich se váže na jeden nebo na více transkripčních proteinů.

Základní rozdíl mezi enhancery a promotory je operační. Enhancerový region jako celek musí být schopen stimulovat transkripci na vzdálenost; toto nemusí platit pro promotorový region nebo pro elementy, ze kterých je složen. Na druhou stranu, promotor musí mít jeden nebo dva elementy, které řídí iniciaci syntesy RNA v určitém místě a v určité orientaci, zatímco enhancery nemají tyto specifické elementy. Promotory a enhancery se často překrývají a sousedí a často se zdá, že mají velmi podobnou organizaci modulů.

Navíc by bylo možno použít jakoukoliv kombinaci promotor/enhancer (jako z Eukaryotic Promotor Data Base EPDB) pro řízení exprese p53 konstruktu. Použití T3, T7 nebo SP6 cytoplasmatického expresního systemu je jiným možným provedením. Eukaryotické buňky mohou podporovat cytoplasmatickou transkripci z jistých bakteriofágových promotorů, pokud je poskytnuta vhodná bakteriofágová polymerasa, buď jako část přenosového komplexu, nebo jako další genetický expresní vektor.

Tabulka 2

Enhancer
Imunoglobulinový těžký řetězec
Imunoglobulinový lehký řetězec
Receptor T-buněk
HLA DQ a DQ ß
ß-interferon
Interleukin-2
Receptor pro interleukin-2
MHC třída II 5
MHC třída II HLA-DRα
ß-aktin
Svalová kreatin kinasa
Prealbumin (Transthyretin)
Elastasa I
Metalothionein
Kolagenasa
Gen pro albumin
α-fetoprotein
tau-globin
ß-globin
c-fos
c-HA-ras
Insulin
Adhesní molekula neurálních buněk (NCAM)
α_1-antitrypsin
H2B (TH2B) histon
Myší nebo typ I kolagen
Glukosou regulované proteiny (GRP94 a GRP78)

22.07.98

tabulka 2 - pokračování

Enhancer
Krysí růstový hormon
Lidský serový amyloid A (SAA)
Troponin I (TN I)
Destičkový růstový faktor
Duchennova svalová dystrofie
SV40
Polyoma
Retroviry
Papilloma virus
Virus hepatitidy B
Virus lidské imunodeficience
Cytomegalovirus
Virus leukemie u opice Gibbon

Dále, výběr promotoru, který je regulován v odpovědi na specifické fyziologické signály, může umožnit indukovatelnou expresi p53 konstruktu. Například s polynukleotidem pod kontrolou lidského PAI-1 promotoru je exprese indukovatelná faktorem nekrosy nádorů. Tabulka 3 ukazuje několik kombinací promotor/induktor:

Tabulka 3

Element	Induktor
MT II	Forbolestery (TFA) těžkých kovů
MMTV (virus myších nádorů prsu)	Glukokortikoidy
ß-interferon	poly(rI)X poly(rc)
Adenovirus 5 E2	Ela
c-jun	Forbolester (TPA), H_2O_2
Kolagenasa	Forbolester (TPA),
Stromelysin	Forbolester (TPA), IL-1
SV40	Forbolester (TPA),
Myší MX gen	Interferon, virus Newcastelské nemoci
GRP78 gen	A23187
α-2-makroglobulin	IL-6
Vimentin	Serum
Gen H-2 kb MHC třídy II	Interferon
HSP70	Ela, SV40 velký T antigen
Proliferin	Forbolester (TPA),
Faktor nekrosy nádorů	FMA
α gen thyroidního stimulačního hormonu	thyreoidní hormon

V určitých provedeních vynálezu může být přenos expresního vektoru do buněk identifikován in vitro nebo in vivo zavedením markeru do expresního vektoru. Marker bude působit identifikovatelné změny v transfektovaných buňkách, které

budou umožňovat snadnou identifikaci exprese. Obvykle vede zavedení markeru pro selekci na lék ke klonování a selekci transformantů. Alternativně mohou být použity enzymy jako je thymidin kinasa (tk) viru herpes simplex (eukaryotická) nebo chloramfenikol acetyltransferasa (CAT) (prokaryotická). Také mohou být použity imunologické markery. Výběr použitého selektovatelného markeru není zásadní, pokud je exprimovatelný spolu s polynukleotidem kodujícím p53. Další příklady selektovatelných markerů jsou odborníkům v oboru dobře známé.

Typicky bude obsažen polyadenylační signál pro způsobení řádné polyadenylace transkriptu. Charakter polyadenylačního signálu není zásadní pro úspěšné provedení vynálezu a může být použita jakákoliv taková sekvence. Vynálezci zde použili SV40 polyadenylační signál, protože je vhodný a protože dobře účinkuje v použitých cílových buňkách. Jako jeden element expresního konstruktu je také uvažován terminator. Tyto elementy mohou sloužit pro zvýšení hladiny přenosu informace a pro minimalizaci čtení z konstruktu do jiných sekvencí.

V preferovaných provedeních předkládaného vynálezu obsahuje expresní konstrukt virový nebo geneticky zpracovaný konstrukt odvozený od virového genomu. Schopnost jistých virů vstupovat do buněk pomocí receptorem zprostředkované endocytosy a, v některých případech, schopnost integrace do chromosomů hostitele, je činí atraktivními kandidáty pro přenos genů do savčích buněk. Nicméně, jelikož bylo ukázáno, že je možné přímé vychytávání holé DNA, stejně jako receptorem zprostředkované vychytávání DNA komplexů (diskutováno dále), nemusí být expresní vektory virové, ale místo nich to může být jakýkoliv plasmid, kosmid nebo fágový konstrukt, který je

22.07.98

schopen podporovat expresi kodovaných genů v savčích buňkách, jako jsou například pUC nebo Bluescript™ plasmidové serie.

Retroviry

Retroviry jsou skupinou jednořetězcových RNA virů charakterizovaných schopností konvertovat svou RNA na dvouřetězcovou DNA v infikovaných buňkách procesem nazývajícím se reversní transkripce (Coffin, 1990). Vzniklá DNA se potom stabilně integruje do buněčných chromosomů jako provirus a přímo syntetizuje virové proteiny. Integrace vede k zachycení virových genových sekvencí v hostitelské buňce a jejím potomstvu. Retrovirový genom obsahuje tři geny - gag, pol a env - které kodují proteiny kapsidy, enzym polymerasa a složky obalu, v příslušném pořadí. Sekvence nacházená upstream od gag genu, nazývaná Ψ, účinkuje jako signál pro inkorporaci genomu do virionů. Sekvence dvou dlouhých terminálních opakujících se úseků (LTR) jsou přítomny na 5' a 3' koncích virového genomu. Tyto obsahují sekvence silného promotoru a enhanceru a jsou také nutné pro integraci do genomu hostitelské buňky (Coffin, 1990).

Při konstrukci retrovirového vektoru je nukleová kyselina kodující p53 insertována do virového genomu místo určitých virových sekvencí pro produkci viru, který je replikace-deficientní. Pro produkci virionů je konstruována souhrnná buněčná linie obsahující gag, pol a env geny, ale bez LTR a složek Ψ(Mann et al., 1983). Když je rekombinantní plasmid obsahující lidskou cDNA, spolu s retrovirovou LTR a Ψ sekvencemi, zaveden do této buněčné linie (například precipitací fosforečnanem vápenatým), pak Ψ sekvence umožňuje

22.07.98

zabalení RNA transkriptu rekombinantního plasmidu do virových částic, které jsou potom secernovány do kultivačního media (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). Medium obsahující rekombinantní retroviry je potom odebráno, volitelně koncentrováno a použito pro genový přenos. Retrovirové vektory jsou schopné infikovat širokou škálu typů buněk. Nicméně, integrace a stabilní exprese vyžadují dělení hostitelských buněk (Paskind et al., 1975).

Nedávno byl vyvinut nový přístup navržený pro umožnění specifického zaměření retrovirových vektorů na základě chemické modifikace retroviru chemickou adicí laktosových zbytků na virový obal. Tato modifikace umožní specifickou infekci hepatocytů prostřednictvím sialoglykoproteinových receptorů.

Byl navržen i odlišný přístup pro zacílení rekombinantních retrovirů, při kterém byly použity biotinylované protilátky proti proteinu retrovirového obalu a proti specifickým buněčným receptorům. Protilátky byly navázány prostřednictvím biotinových složek za použití streptavidinu (Roux et al., 1989). Za použití protilátek proti antigenům hlavního histokomapatibilního komplexu třídy I a třídy II byla demonstrována infekce různých lidských buněk nesoucích tyto povrchové antigeny ekotropními viry in vitro (Roux et al., 1989).

Adenoviry

Lidské adenoviry jsou dvouřetězcové DNA nádorové viry s velikostí genomu asi 36 kb (Tooze, 1981). Jako modelový system

22.07.98

pro expresi eukaryotického genu byly adenoviry intenzivně studovány a charakterizovány, což z nich činí atraktivní system pro vývoj adenoviru jako systemu pro přenos genu. Tato skupina virů je snadná pro kultivaci a manipulaci a vykazuje širokou škálu hostitelů in vitro a in vivo. V lyticky infikovaných buňkách jsou adenoviry schopny vypnout syntesu proteinů hostitele, přinutit buněčné mechanismy k syntese velkých množství virových proteinů a produkovat velká množství viru.

E1 region genomu obsahuje E1A a E1B, které kodují proteiny odpovědné za regulaci transkripce virového genomu, stejně jako několika buněčných genů. E2 exprese, obsahující E2A a E2B, umožňuje syntesu replikačních funkcí viru, např. DNA-vazebného proteinu, DNA polymerasy, a terminálního proteinu, který navozuje replikaci. E3 genový produkt brání cytolýze cytotoxickými T-buňkami a faktorem nekrosy nádorů a zdá se, že je významný pro propagaci viru. Funkce spojené s E4 proteiny zahrnují replikaci DNA, expresi pozdních genů a vypnutí hostitelské buňky. Produkty pozdních genů zahrnují většinu z proteinů kapsidy virionů, a tyto jsou exprimovány pouze poté, co proběhne většina zpracování jednotlivého primárního transkriptu z hlavního pozdního promotoru. Hlavní pozdní promotor (MLP) vykazuje vysokou účinnost během pozdní fáze infekce (Stratford-Perricaudet and Perricaudet, 1991a).

Protože se zdá, že pouze malá část virového genomu musí být v *cis* (Tooze, 1981), nabízejí vektory odvozené od adenoviru vynikající potenciál pro substituci velkých DNA fragmentů, pokud jsou použity spolu s buněčnými liniemi jako jsou 293 buňky. Ad5-transformované lidské embryonální ledvinné buněčné

22.07.98

linie (Graham, et al., 1977) byly vyvinuty pro dodání zásadních virových proteinů v *trans*. Vynálezci tak soudí, že charakteristiky adenovirů je činí dobrými kandidáty pro použití v zacílení nádorových buněk in vivo (Grunhaus and Horwitz, 1992).

Jednotlivé výhody adenovirového systemu pro přenos cizorodých proteinů do buněk zahrnují (i) schopnost substituovat relativně velké části virové DNA cizorodou DNA; (ii) strukturální stabilitu rekombinantních adenovirů; (iii) bezpečnost podání adenoviru lidem; a (iv) chybění jakékoliv známé asociace adenovirové infekce s karcinomy nebo s malignitami; (v) schopnost získání vysokých titrů rekombinantního viru; a (vi) vysokou infekčnost adenoviru.

Další výhody adenovirových vektorů vzhledem k retrovirovým zahrnují vysoké hladiny genové exprese. Kromě toho, replikace adenoviru není závislá na replikaci genů hostitele, narozdíl od retrovirových sekvencí. Soudí se, že protože adenovirové transformující geny v E1 regionu mohou být snadno deletovány a stále ještě vznikají účinné expresní vektory, může být onkogenní riziko způsobené adenovirovými vektory zanedbáno (Grunhaus and Horwitz, 1992).

Obecně, adenovirové systemy pro přenos genů jsou založeny na rekombinantním, zpracovaném adenoviru, který byl zpracován tak, aby byl neschopen replikace delecí části jeho genomu, jako je E1, a stále si uchovává schopnost infekce. Mohou být exprimovány sekvence kodující relativně velké cizorodé proteiny, pokud jsou v adenovirovém genomu provedeny další delece. Například, adenoviry s deletovanými jak E1, tak E3

22.07.98

regiony jsou schopné nést více než 10 kB cizorodé DNA a mohou být kultivovány ve vysokých titrech v 293 buňkách (Stratford-Perricaudet and Perricaudet, 1991a). Překvapivě byla také popsána přetrvávající exprese transgenů po adenovirové infekci.

Adenoviry zprostředkovaný přenos genů je v současnosti zkoumán jako prostředek pro přenos genů do eukaryotických buněk a do celých zvířat. Například, při léčbě myší se vzácnou recesivně dědičnou deficiencí ornithin transkarbamylasy (OTC) bylo zjištěno, že adenovirové konstrukty mohou být použity pro dodání normálního OTC enzymu. Naneštěstí byla exprese normálních hladin OTC dosažena pouze u 4 ze 17 případů (Stratford-Perricaudet et al., 1991b). Proto byl defekt u většiny myší pouze částečně napraven a nevedl k žádné fyziologické a fenotypové změně. Tyto typy výsledků proto nabízejí málo důvodů pro použití adenovirových vektorů v protinádorové terapii.

Pokusy použít adenoviru pro přenos genu pro transmembránový regulátor vodivosti cystické fibrosy (CFTR) do plicního epitelu "cotton" krys byly také částečně úspěšné, ačkoliv nebylo možné hodnotit biologickou aktivitu přeneseného genu v epitelu zvířat (Rosenfeld et al., 1992). Tato studie znovu demonstrovala přenos genu a expresi CFTR proteinu v buňkách plicních cest dýchacích, ale neukázala žádný fyziologický účinek. V článku v Science 1991, Rosenfeld a kol. prokázali expresi proteinu a1-antitrypsinu v plicích, ale opět neprokázali fyziologický účinek. Odhadli totiž, že hladiny exprese, které pozorovali, byly pouze na úrovni 2 % hladiny nutné pro ochranu plic u lidí, t.j. mnohem níže, než je nutné pro fyziologický účinek.

22.07.98

Gen pro lidský α1-antitrypsin byl zaveden do jater normálních krys intraportální injekcí a byl tam exprimován, což vedlo k sekreci zavedeného lidského proteinu do plasmy těchto krys (Jaffe et al., 1992). Nicméně, a bohužel, hladiny, které byly získány, nebyly dostatečně vysoké pro terapeutickou hodnotu.

Tyto typy výsledků nedemonstrují, že adenovirus je schopen řídit expresi proteinu v rekombinantních buňkách dostatečnou pro dosažení fyziologicky relevantního účinku a proto nenaznačují použitelnost adenovirového systemu pro použití ve spojení s protinádorovou terapií. Kromě toho, před předkládaným vynálezem se soudilo, že p53 nemůže být inkorporován do balících buněk, jako jsou ty, které jsou použity pro přípravu adenoviru, protože by mohl být toxický. Jelikož se E1B adenoviru se váže na p53, bylo toto považováno za další důvod toho, proč nemohou být adenovirus a p53 technologie kombinovány.

Jiné virové vektory jako expresní konstrukty

V předkládaném vynálezu mohou být použity jiné virové vektory jako expresní konstrukty. Vektory odvozené od takových virů jako je virus vakcinie (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988), adeno-asociovaný virus (AAV) (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Hermonat and Muzycska, 1984) a herpesviry mohou být použity. Nabízejí některé atraktivní vlasnosti pro různé savčí buňky (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988; Horwich et al., 1990).

22.07.98

S nedávným poznáním defektních virů hepatitidy B byl získán nový pohled na vztah mezi strukturou a funkcí pro různé virové sekvence. In vitro studie ukázaly, že viry si mohou uchovávat schopnost pro na helperech závislou techniku balení a reversní transkripci i přes deleci více než 80% jejich genomu (Horwich et al., 1990). Toto naznačuje, že velké části genomu mohou být nahrazeny cizorodým genetickým materiálem. Hepatotropismus a persistence (integrace) byly zejména atraktivními vlastnostmi pro genový přenos do jater. Chang et al. nedávno zavedl gen pro chloramphenikol acetyltransferasu (CAT) do genomu viru kachní hepatitidy B na místo polymerasu, povrch a pre-povrch kodujících sekvencí. Tento byl spolu s přirozeným typem viru transfektován do buněčné linie ptačího hepatomu. Kultivační medium obsahující vysoké titry rekombinantních virů bylo použito pro infekci primárních kachních hepatocytů. Stabilní CAT genová exprese byla detekována po dobu nejméně 24 dní po transfekci (Chang et al., 1991).

C. Alternativní metody pro přenos genů

Pro expresi p53 konstruktů musí být expresní vektor přenesen do buněk. Jak bylo popsáno výše, preferovaným mechanismem pro přenos je prostřednictvím virové infekce, kde je expresní vektor obalen jako infekční adenovirová částice.

Předkládaný vynález uvažuje také několik nevirových metod pro přenos expresních vektorů do kultivovaných savčích buněk. Tyto zahrnují srážení fosforečnanem vápenatým (Graham and Van der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990), DEAE-dextran (Gopal, 1985), elektroporaci (Tur-Kaspa et al.,

22.07.98

1986; Potter et al., 1984), přímou mikroinjekci (Harland and Weintraub, 1985), liposomy obsahující DNA (Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979) a lipofectamin-DNA komplexy, sonikaci buněk (Fechheimer et al., 1987), genové bomabardování za použití mikroprojektilů s vysokou rychlostí (Yang et al., 1990), polykationty (Boussif et al., 1995) a receptory - zprostředkovanou transfekci (Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988). Některé z těchto technik mohou být úspěšně adaptovány pro použití in vivo nebo ex vivo.

V jednom provedení vynálezu se může adenovirový expresní vektor jednoduše skládat z holého rekombinantního vektoru. Přenos konstruktu může být proveden jakoukoliv z metod uvedených výše, které fyzikálně nebo chemicky permeabilizují buněčnou membránu. Například, Dubensky et al. (1984) úspěšně injikoval polyomavirovou DNA ve formě $CaPO_4$ sraženin do jater a sleziny dospělých a novorozených myší, které vykazovaly aktivní virovou replikaci a akutní infekci. Benvenisty and Neshif (1986) také ukázali, že přímá intraperitoneální injekce $CaPO_4$ precipitovaných plasmidů vede k expresi transfektovaných genů. Předpokládá se, že DNA kodující p53 konstrukt může být také přenesena podobným způsobem in vivo.

Jiné provedení vynálezu pro přenos expresních vektorů holé DNA do buněk může obsahovat bombardování částicemi. Tato metoda spočívá ve schopnosti na vysokou rychlost akcelerovaných potažených mikroprojektilů obsahujících DNA prorazit buněčnou membránu a vstoupit do buněk bez jejich usmrcení (Klein et al., 1987). Bylo vyvinuto několik postupů pro akceleraci malých částic. Jeden takový způsob spočívá ve vysokonapěťovém výboji pro generování elektrického proudu,

22.07.98

který způsobuje hybnou sílu (Ynag et al., 1990). Použité mikroprojektily jsou tvořeny biologicky inertními látkami, jako jsou wolframové nebo zlaté korálky.

Vybrané orgány zahrnující játra, kůži a svalovou tkáň krys a myší byly bombardovány in vivo (Young et al., 1990; Zelenin et al., 1991). Toto může vyžadovat chirurgické obnažení buněk nebo tkání, pro vyloučení jakékoliv vmezeřené tkáně mezi hlavní a cílovým orgánem. DNA kodující p53 konstrukt může být přenesena pomocí této metody.

V dalším provedení předkládaného vynálezu může být expresní vektor obsažen v liposomu. Liposomy jsou vesikulární struktury charakterizované fosfolipidovou dvojvrstvou membránou a vnitřním vodným prostředím. Multilamelární liposomy mají několik lipidových vrstev oddělených vodným mediem. Tvoří se spontálně, když jsou fosfolipidy suspendovány v nadbytku vodného roztoku. Lipidové složky podléhají samopřestavbě před vytvořením uzavřených struktur a zachycují vodu a rozpuštěné látky mezi lipidové dvojvrstvy (Ghosh and Bachhawat, 1991). Také jsou uvažovány lipofectamin-DNA komplexy.

Liposomy zprostředkovaný přenos polynukleotidu a exprese cizorodé DNA in vitro byl velmi úspěšný. Wong et al., (1980), ukázal proveditelnost liposomy zprostředkovaného přenosu a exprese cizorodé DNA v kultivovaných kuřecích embryích, HeLa a hepatomových buňkách. Nicolau et al. (1987) provedl úspěšně liposomy zprostředkovaný genový přenos u krys po intravenosní injekci.

V určitých provedeních vynálezu mohou být liposomy v

22.07.98

komplexu s hemaglutinačním virem (HVJ). Bylo ukázáno, že toto usnadňuje fúzi s buněčnou membránou a navozuje vstup DNA v liposomech do buněk (Kaneda et al., 1989). V jiných provedeních mohou být liposomy v komplexech s nebo mohou být použity spolu s jadernými non-histonovými chromosomálními proteiny (HMG-1) (Kato et al., 1991). V ještě dalších provedeních mohou být liposomy v komplexech s nebo mohou být použity spolu s HVJ a HMG-1. Protože takové expresní vektory byly úspěšně použity pro přenos a expresi polynukleotidu in vitro a in vivo, jsou použitelné pro předkládaný vynález. Pokud je použit bakteriofágový promotor v DNA konstruktu, je také žádoucí, aby byla obsažena v liposomu vhodná bakteriofágová polymerasa.

Jiným mechanismem pro přenos expresních vektorů do buněk je receptorem zprostředkovaný přenos. Tento přístup využívá selektivního vychytávání makromolekul pomocí receptory zprostředkované endocytosy v téměř všech eukaryotických buňkách. Vzhledem ke specifické distribuci různých receptorů na různých typech buněk může být přenos vysoce specifický (Wu and Wu, 1993). Prostředky pro receptory zprostředkovaný přenos genů se obvykle skládají ze dvou složek: specifického ligandu pro buněčný receptor a činidla vážícího DNA. Pro receptory zprostředkovaný přenos genů bylo použito několik ligandů. Nejlépe charakterizovanými ligandy jsou asialoorosomukoid (ASOR) (Wu and Wu, 1987) a transferrin (Wagner et al., 1993). Nově byl jako prostředek pro přenos genu použit syntetický neoglykoprotein, který rozpoznává stejný receptor jako ASOR (Ferkol et al., 1993; Perales et al., 1994) a epidermální růstový faktor (EGF) byl také použit pro přenos genů do buněk spinocelulárního karcinomu (Myers, EPO 0273085).

22.07.98

V jiných provedeních může prostředek přenosu obsahovat ligand a liposom. Například, Nicolau et al. (1987) použil laktosyl-ceramid, asialogangliosid s terminální galaktosou, inkorporovaný do liposomů, a pozoroval zvýšení vychytávání genu pro insulin hepatocyty. Tak je proveditelné, aby byl adenovirový expresní vektor také specificky dopraven do typu buněk jako jsou plicní, epitelové nebo nádorové buňky, pomocí jakéhokoliv počtu systemů receptor-ligand, s nebo bez liposomů. Například, epidermální růstový faktor (EGF) může být použit jako receptor pro řízený přenos p53 konstruktu do mnoha nádorových buněk, které vykazují zvýšenou expresi EGF receptoru. Manosa může být použita pro zaměření receptoru pro manosu na jaterních buňkách. Také protilátky k CD5 (CLL), CD22 (lymfomy), CD25 (T-buněčná leukemie) a MAA (melanom) mohou být podobně použity jaké zaměřovací skupiny.

V jistých provedeních může být přenos genu lépe proveden za podmínek ex vivo. Ex vivo genová terapie označuje izolaci buněk ze zvířete, přenos polynukleotidu do buněk, in vitro, a potom vrácení modifikovaných buněk zpět do zvířete. Toto může obsahovat chirurgické odstranění tkání/orgánů ze zvířete nebo primární kultivaci buněk a tkání. Anderson et al., U.S. patent 5 399 346, zde uvedený jako celek, popisuje ex vivo terapeutické metody. Během ex vivo kultivace mohou expresní vektory exprimovat p53 konstrukt. Nakonec, buňky mohou být znovu zavedeny do původního zvířete, nebo mohou být podány jinému zvířeti, ve farmaceuticky přijatelné formě jakýmkoliv z prostředků ppsaných dále.

D. Farmaceutické přípravky a způsoby podání

Pokud je uvažována klinická aplikace adenovirového expresního vektoru podle předkládaného vynálezu, pak je nutné připravit komplex jako farmaceutický přípravek vhodný pro zamýšlenou aplikaci. Obecně bude toto znamenat přípravu farmaceutického přípravku, který je v podstatě prostý pyrogenů, stejně jako jiných nečistot, které by mohly být škodlivé lidem nebo zvířatům. Bude také obecně žádoucí použití vhodných solí a pufrů, které budou činit komplex stabilní a umožní vychytávání komplexu cílovými buňkami.

Vodné přípravky podle předkládaného vynálezu obsahují účinné množství expresního vektoru, rozpuštěného nebo dispergovaného ve farmaceuticky přijatelném nosiči nebo ve vodném mediu. Takové přípravky jsou také označovány jako inokula. Fráze "farmaceuticky nebo farmakologicky přijatelné" označuje molekulové skupiny a přípravky, které neprodukují vedlejší, alergické nebo jiné nežádoucí reakce, když jsou podány lidem nebo zvířatům. Jak je zde použito zahrnuje "farmaceuticky přijatelný nosič" jakékoliv z rozpouštědel, disperzních medií, potahů, antibakteriálních antifugálních činidel, izotonických a absorpci zpomalujícícch činidel a podobně. Použití takových medií a činidel pro farmaceuticky aktivní substance je v oboru dobře známé. Pokud není konvenční medium nebo činidlo inkopatibilní s aktivní složkou, je jeho použití v terapeutickém přípravku bráno v úvahu. Doplňkové aktivní složky také mohou být inkorporovány do přípravků.

Roztoky aktivních sloučenin jako volných bazí nebo jako farmakologicky přijatelných solí mohou být připraveny ve vodě

22.07.98

vhodně smísené se surfaktantem, jako je hydroxypropylcelulosa. Disperze také mohou být připraveny v glycerolu, kapalných polyethylenglykolech, jejich směsích a v olejích. Za řádných podmínek pro skladování a použití obsahují tyto přípravky konzervační činidlo pro zabránění růstu mikroorganismů.

Expresní vektory a prostředky pro přenos podle předkládaného vynálezu mohou zahrnovat klasické farmaceutické přípravky. Podáních terapeutických přípravků podle předkládaného vynálezu může být provedeno jakýmkoliv vhodným způsobem, pokud je cílová tkáň tímto způsobem dosažitelná. Tyto způsoby zahrnují orální, nasální, bukální, rektální, vaginální nebo lokální podání. Alternativně, podání může být ortotopické, intradermální, intraokulární, subkutánní, intramuskulární, intraperitoneální nebo intravenosní injekcí. Takové přípravky budou normálně podány jako farmaceuticky přijatelné přípravky, které budou obsahovat fyziologicky přijatelné nosiče, pufry nebo jiné přísady.

Terapeutické přípravky podle předkládaného vynálezu jsou výhodně podány ve formě injikovatelných přípravků buď jako kapalné roztoky, nebo jako suspense; pevné formy vhodné pro rozpuštění v, nebo pro suspendování v kapalině před injekcí mohou být také připraveny. Tyto přípravky také mohou být emulsifikovány. Typický přípravek pro takový účel obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič. Například, kompozice může obsahovat 10 mg, 25 mg, 50 mg nebo více než 100 mg lidského sérového albuminu na mililitr fosfátem pufrovaného salinického roztoku. Jiné farmaceuticky přijatelné nosiče zahrnují vodné roztoky, netoxické přísady, včetně solí, konzervačních látek, pufrů a podobně. Příklady non-vodných rozpouštědel jsou

propylenglykol, polyethylenglykol, rostlinné oleje a injikovatelné organické estery jako je ethyloleat. Vodné nosiče zahrnují vodu, roztoky alkohol/voda, salinické roztoky, parenterální vehikula jako je chlorid sodný, Ringerova dextrosa, atd. Intravenosní roztoky mohou zahrnovat roztoky kapalin a živin. Konzervační látky zahrnují antimikrobiální činidla, antioxidanty, chelační činidla a inertní plyny. pH a přesná koncentrace různých složek ve farmaceutickém přípravku jsou upraveny podle dobře známých parametrů.

Další formulace jsou vhodné pro orální podání. Orální formulace obsahují takové typické přísady, jako jsou například farmaceutické koncentrace manitolu, laktosy, škrobu, stearanu hořečnatého, sacharinu sodného, celulosy, uhličitanu hořečnatého a podobně. Přípravky mají formu roztoků, suspenzí, tablet, pilulek, kapslí, přípravků se zpomaleným uvolňováním a nebo prášků. Pokud je způsob podání lokální, pak mohou být ve formě krému, masti, balzámu, kapaliny nebo spraye.

Účinné množství terapeutického agens je určeno na základě zamýšleného cíle, například (i) inhibice proliferace nádorových buněk nebo (ii) eliminace nádorových buněk. Termín "jednotková dávka" označuje fyzikálně oddělenou jednotku vhodnou pro použití u subjektu, kde každá jednotka obsahuje předem určené množství terapeutického přípravku vypočítané pro dosažení požadovaných odpovědí, jak byla diskutována výše, spolu s jejím podáním, t.j. vhodným způsobem a léčebným režimem. Množství, které má být podáno, jak z hlediska počtu podání, tak z hlediska jednotkové dávky, závisí na léčeném subjektu, na stavu subjektu a požadované ochraně. Přesné množství terapeutického přípravku také závisí na úvaze lékaře

22.07.98

a je odlišné pro každého jednotlivce.

V jistých provedeních může být žádoucí poskytnout kontinuální dodávku terapeutického přípravku pacientovi. Pro intravenosní a intraarteriální způsoby podání je toto provedeno systemem kapaček. Pro lokální podání bude použito opakované podání. Pro různé přístupy mohou být použity přípravky se zpomaleným uvolňováním, které dodávají omezené, ale konstantní množství terapeutického činidla během prodlouženého časového období. Pro vnitřní aplikaci může být preferována kontinuální perfuse požadovaného regionu. Toto může být provedeno katetrizací, post-operačně v některých případech, po které následuje kontinuální podání terapeutického přípravku. Doba perfuse bude vybrána lékařem pro jednotlivého pacienta a situaci, ale bude v rozsahu od asi 1 - 2 hodin do 2 - 6 hodin, do asi 6 - 10 hodin, do asi 10 - 24 hodin, do asi 1 - 2 dní, do asi 1 - 2 týdnů nebo déle. Obecně, dávka terapeutického přípravku podaná kontinuální perfuzí bude ekvivalentní dávce podané jednou nebo více injekcemi, upravená pro dobu, během které jsou injekce podány. Nicméně, soudí se, že perfusí mohou být podány vyšší dávky.

Klinický protokol pro SCCHN

Klinický protokol byl vyvinut pro usnadnění léčby SCCHN onemocnění za použití adenovirových konstruktů diskutovaných dále v příkladech. Podle tohoto protokolu budou vybráni pacienti mající histologicky ověřený spinocelulární karcinom hlavy a krku. Pacienti mohou, ale nemusí mít předchozí chemo-, radio- nebo genovou terapii. Optimálně bude mít pacient adekvátní funkci kostní dřeně (definovanou jako absolutní

22.07.98

počet periferních granulocytů > 2000/m^3 a trombocytů 100000/mm^3), adekvátní funkci jater (bilirubin ≤ 1,5 mg/dl) a adekvátní funkci ledvin (kreatinin < 1,5 mg/dl).

Protokol vyžaduje podání jedné dávky farmaceutického přípravku obsahujícího 10^6 a 10^9 infekčních částic p53 adenovirového expresního konstruktu intratumorální injekcí. Pro tumory ≥ 4 cm bude podaný objem 4 - 10 ml (přednostně 10 ml), zatímco pro tumory < 4 cm bude použit objem 1 - 3 ml (přednostně 3 ml). Pro jednu dávku bude podáno několik injekcí v objemech 0,1 - 0,5 ml s rozestupem přibližně 1 cm nebo více.

Léčebný kurs se skládá z asi 6 dávek, podaných během 2 týdnů. Podle úvahy lékaře může režim pokračovat, šest dávek každé dva týdny, nebo méně častokrát (měsíčně, za dva měsíce, kvartálně, atd).

Pokud je pacient vhodný pro chirurgickou resekci, pak bude tumor léčen jak je popsáno výše po alespoň dva následující dvojtýdení léčebné kursy. V průběhu jednoho týdne po dokončení druhého (nabo více, např. třetího, čtvrtého, pátého, šestého, sedmého, osmého atd.) kursu bude u pacienta provedena chirurgická resekce. Před uzavřením incize bude podáno do místa chirurgického zákroku (operačního lůžka) 10 ml farmaceutického přípravku obsahujícího p53 adenovirový expresní konstrukt (10^6 - 10^9 infekčních částic) a bude umožněn kontakt po dobu alespoň 60 minut. Rána se uzavře a umístí se do ní dren nebo katetr. Třetí den po operaci se podá dalších 10 ml farmaceutického přípravku drenem a ponechá se v kontaktu s operačním lůžkem po dobu alespoň dvou hodin. Potom se provede odsátí a dren se odstraní v klinicky vhodnou dobu.

22.07.98

Léčba arteficiálních a přirozených tělesných dutin

Jedním z primárních zdrojů recidivujících SCCHN je reziduální, mikroskopické onemocnění, které zůstává v primárním místě nádoru, stejně jako lokálně a regionálně, po excisi tumoru. Kromě toho, analogická situace vzniká, když jsou tělesné dutiny postiženy mikroskopickým rozsevem nádorových buněk. Účinná léčba takového mikroskopického onemocnění bude přinášet signifikantní výhodu v terapeutických režimech.

Tak, v určitých provedeních může být nádor odstraněn chirurgickou excisí, která vytvoří "dutinu". Jak v době chirurgického zákroku, tak potom (periodicky nebo kontinuálně), je terapeutický přípravek podle předkládaného vynálezu podán do tělesné dutiny. Toto je, v podstatě, "lokální" léčba povrchu dutiny. Objem přípravku by měl být dostatečný pro zajištění toho, že celý povrch dutiny je v kontaktu s expresním konstruktem.

V jednom provedení, podání bude jednoduše obsahovat injekci terapeutického přípravku do dutiny tvořené excisí nádoru. V jiném provedení může být žádoucí mechanická aplikace pomocí hubky, tamponu nebo jiného prostředkuKterýkoliv z těchto přístupů může být použit po odstranění nádoru stejně jako během počátečního chirurgického zákroku. V ještě jiném provedení je kathetr vložen do dutiny před uzavřením chirurgického přístupu. Dutina potom může být kontinuálně perfundována po požadovanou dobu.

V jiné formě této léčby je "lokální" aplikace

terapeutického přípravku zacílena do přirozené dutiny jako jsou ústa, hltan, jícen, hrtan, průdušnice, pleurální dutina, peritoneální dutina, nebo dutiny dutých orgánů jako je močový měchýř, tlusté střevo nebo jiné viscerální orgány. V této situaci může a nemusí být primární signifikantní tumor v dutině. Léčba je zaměřena na mikroskopické onemocnění v dutině, ale počátečně může být použita pro ovlivnění primární nádorové hmoty, pokud nebyla dříve odstraněna, nebo pre-neoplastických lézí, které mohou být přítomné v této dutině. Opět, různé metody mohou být použity pro provedení "lokálního" podání do těchto viscerálních orgánů nebo povrchů dutin. Například, dutina ústní v hltanu může být jednoduše vyplachována a může být prováděno kloktání roztoků. Nicméně, lokální podání v hrtanu a průdušnici může vyžadovat endoskopickou vizualizaci a lokální podání terapeutického přípravku. Viscerální orgány jako je močový měchýř nebo sliznice tlustého střeva mohou vyžadovat trvalý katetr s infuzí a opět přímou vizualizaci cystoskopem nebo jiným endoskopickým přístrojem. Dutiny jako je pleurální a peritoneální mohou být zpřístupněny trvalým katetrem nebo chirurgickým zákrokem zpřístupňujícím tyto oblasti.

Sledování exprese p53 po podání

Jiný aspekt předkládaného vynálezu zahrnuje sledování exprese p53 po podání terapeutického přípravku. Protože destrukce mikroskopických nádorových buněk nemůže být pozorována, je významné určit to, zda cílové místo bylo účinně uvedeno do kontaktu s expresním konstruktem. Toto může být provedeno identifikací buněk, ve kterých expresní konstrukt aktivně produkuje p53 produkt. Důležitá je, nicméně, schopnost

22.07.98

rozlišení mezi exogenním p53 a p53 přítomným v nádorových a nenádorových buňkách v léčené oblasti. Označení exogenního p53 značkovacím elementem poskytne definitivní důkaz exprese této molekuly a nikoli její endogenní verze.

Jeden takový značkovací element poskytuje FLAG biosystem (Hopp et al., 1988). FLAG polypeptid je oktapeptid (AspTyrLysAspAspAspAspLys) a jeho malá velikost nenarušuje expresi proteinu podané genové terapie. Společná exprese FLAG a požadovaného proteinu je sledována za použití protilátek namířených proti FLAG proteinu.

Mohou být použity i jiné imunologické značkovací systemy, jako je 6XHis system (Qiagen). Pro tento způsob může být použit jakýkoliv lineární epitop pro generování fúzního proteinu s p53, pokud (i) není fúzí narušena imunologická integrita epitopu a (ii) není fúzí narušena funkční integrita p53.

E. Protokoly kombinované terapie

Rezistence nádorové buňky k prostředkům poškozujícím DNA představuje hlavní problem klinické onkologie. Jedním z cílů současného výzkumu nádorů je nalézt cestu ke zvýšení účinnosti chemo- a radioterapie jejich kombinací s genovou terapií. Například gen pro thymidin kinasu viru herpes simplex (HS-tK), při podání do mozkových nádorů pomocí retrovirového vektorového systemu úspěšně indukuje citlivost k antivirovému prostředku ganciclovíru (Culver et al., 1992). V kontextu předkládaného vynálezu se předpokládá, že podobně je možno ve spojení s chemo- nebo radioterapeutickými intervencemi použít terapii p53.

22.07.98

Pro usmrcení buněk, jako jsou maligní nebo metastazující buňky, za použití metod podle předkládaného vynálezu, je obecně zapotřebí kontaktovat "cílovou" buňku s expresním vektorem a alespoň jedním činidlem poškozujícím DNA. Tyto kompozice by měly být k dipsozici v kombinovaném množství účinném pro usmrcení nebo inhibici proliferace buněk. Tento proces může zahrnovat kontaktování buněk současně s expresním vektorem a prostředkem nebo faktorem poškozujícím DNA. Tohoto může být dosaženo kontaktováním buněk s jediným přípravkem nebo farmakologickou formulací, která obsahuje obě činidla, nebo kontaktováním buněk se dvěma různými přípravky nebo formulacemi ve stejnou dobu, kde jeden přípravek obsahuje p53 expresní vektor a druhý obsahuje činidlo poškozující DNA.

Alternativně může léčba p53 předcházet nebo následovat po léčbě činidlem poškozujícím DNA s intervaly v rozmezí od minut do týdnů. V provedeních, kde jsou faktor poškozující DNA a p53 expresní vektor aplikovány do buňky odděleně, je obecně potřeba zajistit, aby mezi takovými podáními neuběhla významná doba, tak, aby činidlo poškozující DNA a expresní vektor byly stále schopné vykazovat v buňce výhodný kombinovaný účinek. V takových případech se předpokládá, že bude proveden kontakt buněk s oběma přípravky v průběhu 6 hodin až jednoho týdne, a lépe během 24 až 72 hodin, kde nejvíce je preferována doba 48 hodin. V některých situacích nicméně může být žádoucí periodu léčby významně prodloužit tak, že mezi jednotlivými podáními uplyne několik dní (2, 3, 4, 5, 6, nebo 7) až několik týdnů (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 nebo 8).

Je také představitelné, že bude žádoucí více než jedno podání p53 konstruktu nebo činidla poškozujícího DNA. Mohou být použity různé

22.07.98

kombinace, kde p53 je "A" a agens poškozující DNA je "B":

A/B/A	B/A/B	B/B/A	A/A/B	B/A/A	A/B/B	A/B/B/B
B/B/B/A	B/B/A/B	A/A/B/B	A/B/A/B	A/B/B/A	B/B/A/A	B/A/B/B
B/A/B/A	B/A/A/B	A/A/A/B	B/A/A/A	A/B/A/A	A/A/B/A	B/A/A/B

Pro dosažení smrti buněk jsou obě agens podána do buněk v kombinovaném množství účinném pro zabíjení buněk.

Agens nebo faktory poškozující DNA jsou zde definovány jako jakékoliv chemické sloučeniny nebo způsoby léčby, které indukují poškození DNA, když jsou aplikovány do buněk. Taková činidla a faktory zahrnují radiaci a vlny, které indukují poškození DNA jako je τ-záření, záření X, UV záření, mikrovlny, emise elektronů, a podobně. Různé chemické sloučeniny, také nazývané (chemoterapeutická činidla), účinkují tak, že indukují poškození DNA, a u všech se předpokládá, že mohou být použity ve způsobech kombinované léčby, které jsou zde popsány. Chemoterapeutické látky, které mohou být použity, zahrnují například adriamycin, 5-fluorouracil (5FU), etoposid (VP-16), camptothecin, aktinomycin-D, mitomycin C, cis-platinu (CDDP), a i peroxid vodíku. Vynález také zahrnuje použití kombinace jednoho nebo více činidel poškozujících DNA, ať na základě radiace nebo sloučenin, jako je použití záření X s cisplatinou nebo použití cis-platiny s etoposidem. V určitých provedeních je zejména preferováno použití cis-platiny v kombinaci s p53 expresním vektorem.

Při léčbě nádorů podle předkládaného vynálezu je zapotřebí uvést do kontaktu nádorové buňky s činidlem poškozujícím DNA, spolu s kontaktováním s expresním vektorem. Tohoto může být dosaženo ozařováním lokalizovaného místa nádoru zářením

22.07.98

způsobujícím poškození DNA, jako je záření X, UV-záření, τ-záření nebo mikrovlny. Alternativně mohou být nádorové buňky uvedeny do kontaktu s činidlem poškozujícím DNA tak, že se subjektu podá terapeuticky účinné množství farmaceutické kompozice obsahující sloučeninu poškozující DNA, jako je adriamycin, 5-fluorouracil, etopodsid, camptothecin, aktinomycin D, mitomycin C nebo výhodně cis-platina. Činidlo poškozující DNA může být připraveno a použito jako kombinovaný farmaceutický přípravek nebo kit kombinací s p53 expresním vektorem, jak bylo popsáno výše.

Předpokládají se a zde popisují činidla, která přímo síťují polynukleotidy, konkrétně DNA, pro vyvolání poškození DNA, které bude vést k synergní antineoplastické kombinaci. Mohou být použita agens jako je cis-platina a jiná agens způsobující alkylaci DNA. Cis-platina je rozsáhle používána pro léčbu nádorů, kdy účinné dávky používané v klinických aplikacích jsou 20 mg/m^2 po dobu 5 dní jednou za tři týdny, celkem tři serie. Cis-platina se nevstřebává orálně, a proto musí být podána injekčně intravenosně, podkožně, intranádorově nebo intraperitoneálně.

Agens, která poškozují DNA, také zahrnují sloučeniny, které interferují s replikací DNA, s mitosou a se segregací chromosomů. Takové chemoterapeutické sloučeniny zahrnují adriamycin, též známý jako doxorubicin, etoposid, verapamil, podophyllotoxin a podobně. V běžně používané klinické léčbě neoplasií jsou tyto sloučeniny podávány bolusovou injekcí intravenosně v dávce od 25 až 75 mg/m^2 v intervalu 21 dní pro adriamycin do 35 až 50 mg/m^2 pro intravenosní etoposid nebo dvojnásobnou dávku pro orální podání.

Činidla, která narušují syntesu a spolehlivost prekursorů polynukleotidů a podjednotek také vedou k poškození DNA. Byl

22.07.98

vyvinut velký počet prekursorů polynukleotidů. Zejména jsou používána činidla, u kterých proběhlo rozsáhlé testování a která jsou snadno dostupná. Taková činidla, jako je 5-fluorouracil (5-FU), jsou přednostně využívána neoplastickou tkání, což činí toto činidlo zejména výhodným pro cílenou terapii neoplastických buněk. Ačkoliv je dosti toxický, je 5-FU aplikovatelný v široké škále nosičů, včetně nosičů pro lokální podání, nicméně běžně se používá intravenosní podání s dávkami v rozmezí 3 - 15 mg/kg/den.

Jiné faktory, které způsobují poškození DNA a které jsou široce používány, zahrnují ty, které jsou obecně známé, jako je γ-záření, záření X a/nebo přímé podání radioizotopů do nádorových buněk. Jiné formy faktorů poškozujících DNA jsou také brány v úvahu, jako jsou mikrovlny a UV-záření. Je velmi pravděpodobné, že všechny tyto faktory způsobují širokou škálu poškození DNA, nebo prekursorů DNA, replikace a oprav DNA, a seskupení a integritu chromosomů. Dávky záření X jsou v rozsahu od denní dávky 50 až 200 rentgenů po delší časové období (3 až 4 týdny), do jedné dávky 2000 až 6000 rentgenů. Dávky pro radioizotopy se velmi liší a závisejí na poločasu izotopu, intenzitě a typu emitovaného záření a na vychytávání izotopu nádorovými buňkami.

Odborník je odkázán na "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15. vydání, kapitola 33, zejména stránky 624 - 652. Některé variace v dávkách budou nutné v závislosti na stavu léčeného subjektu. Osoba odpovědná za podání bude, v každém případě, určovat vhodnou dávku pro jednotlivý subjekt. Kromě toho, pro podání lidem by měl přípravek splňovat standardy sterility, pyrogenicity, obecné bezpečnosti a čistoty vyžadované FDA Office of Biological standards.

Vynálezci soudí, že regionální podání p53 expresních vektorů pacientovi s karcinomem vázaným na p53 bude velmi účinným způsobem pro podání terapeuticky účinného genu v boji proti klinickému onemocnění. Podobně, chemo- nebo radioterapie může být zaměřena na určitý postižený region v těle subjektu. Alternativně, za jistých okolností může být vhodné systemové podání expresního vektoru nebo činidla poškozujícího DNA, například tehdy, když se jedná o rozsáhlý metastatický proces.

Terapie cytokiny byla také ověřena jaké účinný partner pro kombinované terapeutické režimy. V takových kombinavaných přístupech mohou být použity různé cytokiny. Příklady cytokinů zahrnují IL-1α, IL-1ß, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, TGF-ß, GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNFα, TNFß, LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN-α, IFN-ß, IFN-τ. Cytokiny jsou podány ve standartních režimech, jak je popsáno dále, v souladu s klinickými indikacemi jako je stav pacienta a relativní toxicita cytokinu.

Kromě kombinace p53 cílené terapie s chemo-, radio-, a cytokinovou terapií je také uvažováno, že kombinace s jinými genovými terapiemi by mohla být výhodná. Například, zacílení K-ras a p53 mutací ve stejnou dobu může produkovat zlepšenou protinádorovou léčbu. Jakýkoliv jiný gen spojený s nádory může být tímto způsobem zaměřen, například p21, p16, p27, E_2F, Dp rodina genů, Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, FCC, MCC, další ras molekuly, *myc, neu, raf, erb, src, fms, jun, trk, ret, gsp, hst, bcl,* a *abl*. Může být také žádoucí kombinovat p53 terapii s genovou terapií založenou na protilátkách obsahující použití jednořetězcového protilátkového konstruktu, ve kterém se protilátka váže na jakékoliv jiné

22.07.98

výše uvedené molekuly, nebo v kombinaci s geny kodujícími jeden nebo více z výše uvedených cytokinů. Také může být výhodné kombinovat p53 s jinými geny, u kterých se předpokládá účast na procesu apoptosy, např. s adenovirovým E1A, Bax, BCL-X_S, atd.

F. Kity

Všechny základní materiály a činidla nutná pro inhibici proliferace nádorových buněk mohou být obsažena společně v kitu. Tento kit bude obecně obsahovat vybrané adenovirové expresní vektory. Také mohou být obsažena různá media pro replikaci expresních vektorů a hostitelské buňky pro takovou replikaci. Takové kity budou obsahovat různé kontainery pro každé jednotlivé činidlo.

Pokud jsou složky kitu poskytnuty v jednom nebo více kapalných roztocích, pak je kapalný roztok preferovaně vodný roztok, kdy je zejména upřednostňován sterilní vodný roztok. Pro použití in vivo může být expresní vektor formulován do farmaceuticky přijatelné injikovatelné kompozice. V takovém může být kontainer inhalator, injekční stříkačka, pipeta, oční kapátko, nebo jiný podobný přístroj, ze kterého může být přípravek aplikován do postižené oblasti těla, jako jsou plíce, injikován do zvířete, nebo může být nanesen a smísen s jinými složkami kitu.

Složky kitu mohou také být dodány v sušené nebo lyofilizované formě. Pokud jsou činidla nebo složky dodány v sušené formě, pak může být obecně rekonstituce provedena přidáním vhodného rozpouštědla. Předpokládá se, že rozpouštědlo může být také dodáno ve zvláštním kontaineru.

Kity podle předkládaného vynálezu budou typicky obsahovat

22.07.98

prostředek pro skladování lahviček v těsném uskladnění pro komerční prodej jako, například, injekce nebo vyfouknuté plastové kontainery, ve kterých jsou požadované lahvičky uchovávány. Bez ohledu na počet nebo typ kontainerů mohou kity podle předkládaného vynálezu také obsahovat, nebo být baleny s nástrojem pro provedení injekce/podání nebo umístění konečného komplexu kompozice v těle zvířete. Takovým nástrojem může být inhalator, injekční stříkačka, pipeta, kleště, odměrná lžička, oční kapátko nebo jakýkoliv jiný v medicině používaný prostředek pro podání.

G. Zvířecí model pro mikroskopický rozsev nádoru a zbytkové onemocnění

Jiný aspekt předkládaného vynálezu obsahuje vývoj zvířecího modelu pro analýzu mikroskopických zbytkových karcinomů a mikroskopického rozsevu v tělesných dutinách. "Karcinom", jak je zde použito, může označovat jednotlivou buňku nebo mnohobuněčné nádorové hmoty. V mikroskopickém onemocnění se "nádor" skládá z jedné nebo několika nádorových buněk, které nemohou být pozorovány pouhým okem.

Zvířecí model zde popsaný je zejména výhodný v napodobení (i) post-chirurgického prostředí u pacientů s nádorem hlavy a krku, zejména u pokročilých stadií onemocnění a (ii) tělesných dutin postižených subjektů, u kterých byl stanoven mikroskopický karcinom. Model, podobně jako jiné zvířecí modely pro nádory, je založen na inokulaci nádorových buněk do zvířete. Odlišnost, nicméně, spočívá ve vytvoření podkožního vaku, který je fyziologickým ekvivalentem přirozené tělesné dutiny nebo dutiny chirurgicky vytvořené excisí nádorových hmot.

Vynálezci používají "holé" myši jako modelový organismus. Nicméně, pro předkládaný vynález může být použito v podstatě kterékoliv zvíře. Zejména upřednostňovanými zvířaty budou malí savci, kteří jsou rutině používáni v laboratorních protokolech. Ještě více preferovanými zvířaty budou hlodavci, jako jsou myši, krysy, morčata a křečci. Králící jsou také preferovaným druhem. Kriteria pro výběr zvířete budou hlavně záviset na preferencích výzkumníka.

Prvním krokem je vytvoření tkáňové řasy u pokusného zvířete. Termín "tkáňová řasa" znamená jakoukoliv excisi v tkáni zvířete, která obnaží cílovou tkáň. Obecně je preferováno, aby byla incise provedena v oblasti hřbetu zvířete, jelikož to představuje snadno dostupné místo. Nicméně, je jasné že incise může být provedena na jiných místech zvířete, a volba místa tkáně bude záviset na různých faktorech jako je jednotlivý typ terapeutických látek, které jsou zkoumány.

Jakmile je cílová tkáň obnažena, tak jsou nádorové buňky, buď individuálně nebo v mikroskopických nádorech, uvedeny do kontaktu se tkání. Nejvhodnější způsob pro implantaci nádorových buněk do tkáně je aplikace suspense tkáňového kultivačního media obsahujícího buňky do tkáně. Aplikace nádorových buněk může být provedena jednoduše za použití sterilní pipety nebo jakéhokoli vhodného aplikátoru. Přirozeně, tento postup bude proveden za sterilních podmínek.

V jednom provedení je $2,5 \times 10^6$ SCCHN buněk inokulováno do obnažené tkáňové řasy holé myši. Odborníci v oboru snadno určí, co znamená pro daný účel vhodný počet buněk. Počet buněk bude

22.07.96

záviset na různých faktorech, jako je velikost zvířete, místo incise, replikační kapacita nádorových buněk samotných, uvažovaná doba růstu nádoru, potenciál testovaného protinádorového činidla a podobně. Ačkoliv stanovení optimálního modelového systemu pro jakýkoliv jednotlivý typ nádoru může vyžadovat určitou úpravu počtu podaných buněk, neznamená to nadměrné experimentování. Odborníci v oboru testů na zvířatech uznají, že taková optimalizace je nutná.

Ta může být provedena například provedením předběžných studií, ve kterých je zvířeti podán různý počet buněk a po uzavření tkáňové řasy je sledován buněčný růst. Podání většího počtu buněk přirozeně povede ke větší populaci mikroskopických zbytkových nádorových buněk.

V předkládané studii byly kapsy účinně uzavřeny za použití matracových stehů. Nicméně předpokládá se, že odborníci v oboru mohou použít jakoukoliv z mnoha metod rutinně používaných pro uzavření incise, jako je použití adhesiv, svorek, švů, stehů atd., podle určitého zamýšleného použití.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady jsou uvedeny pouze pro ilustraci určitých specifických provedení a žádným způsobem by neměly být považovány za omezení rozsahu vynálezu.

Příklad 1

Potlačení růstu buněk lidských nádorů hlavy a krku zavedením přirozeného p53 genu pomocí rekombinantního adenoviru

Materiál a metody

Buněčné linie a kultivační podmínky. Lidské SCCHN buněčné linie Tu-138 a Tu-177 byly obě získány v Department of Head and Neck Surgery, M.D. Anderson Cancer Center. Tu-138 a Tu-177 byly získány z gingivo-labiálního středně diferencovaného spinocelulárního karcinomu a ze špatně diferencovaného spinocelulárního karcinomu laryngu, v příslušném pořadí. Obě linie byly vyvinuty primární explantační technikou a jsou cytokeratin pozitivní a tumorigenní u athymických holých myší a SCID myší. Tyto buňky byly kultivovány v DMEM/F12 mediu doplněném 10% teplem inaktivovaným fetálním hovězím sérem (FBS) s penicilin/streptomycinem.

Příprava rekombinantního adenoviru a infekce. Rekombinantní p53 adenovirus (Ad5CMV-p53) (Zhang et al., 1994) obsahuje cytomegalovirový (CMV) promotor, přirozenou p-53 cDNA a SV40 polyadenylační signál v minigenové kazetě insertované do E1-deletovaného regionu modifikovaného adenoviru typu 5 (Ad 5). Zásoba viru byla propagována v 293 buňkách. Buňky byly sklízeny 36 - 40 hodin po infekci, peletovány, resuspendovány ve fosfátem pufrovaném salinickém roztoku, lyzovány a buněčná drť byla odstraněna přečištěním CsCl gradientem. Koncentrovaný virus byl dialyzován, rozdělen do aliquot a uskladněn při -80 °C. Infikování bylo provedeno přidáním viru ve DMEM/F12 mediu a 2% FBS k buněčné monovrstvě, buňky byly inkubovány při 37 °C po dobu 60 minut s trvalým mícháním, potom bylo přidáno kompletní medium (DMEM/F12/10% FBS) a buňky byly inkubovány při 37 °C po požadovanou dobu.

Northern blot analýza. Celková RNA byla izolována metodou kyselina-guanidiniumthiokyanat podle Chomczynski a Sacchi, 1987. Northern analýza byla provedena na 20 μg celkové RNA. Membrána byla hybridizována p53 cDNA probou značenou metodou náhodného primeru v 5 x SSC/5X Denhartův roztok/0,5% SDS/denaturovaná pstruží spermatická DNA (20 μg). Membrána byla

22.07.98

také očištěna a reprobována GAPDH cDNA pro kontrolu zavedení RNA. Relativní množství exprivovaného p53 byly určeny densitometrií (Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA).

Western blot analýza. Celkové buněčné lyzáty byly připraveny sonikací buněk 24 hodin po infekci v RIPA pufru (150 mM NaCl, 1,0% NP-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 50 mM Tris, pH 8,0) po dobu 5 s. 50 μg proteinu ze vzorků bylo podrobeno 10% SDS-PAGE a přeneseno do Hybond-ECL membrány (Amersham). Membrána byla blokována Blotto/Tween (5% netučné sušené mléko, 0,2% Tween 20, 0,02% a azid sodný ve fosfátem pufrovaném salinickém roztoku) a byla sondována primárními protilátkami, myší anti-lidský p53 monoklonální protilátkou PAb1801 a myší anti-lidský ß-aktin monoklonální protilátkou (Amersham) a sekundární protilátkou, s křenovou peroxidasou konjugovaným kozím anti-myším IgG (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Membrána byla zpracována a vyvíjena podle doporučení výrobce.

Imunohistochemická analýza. Infikované buněčné monovrstvy byly fixovány 3,8% formalinem a ošetřeny 3% H_2O_2 v methanolu po dobu 5 minut. Imunohistochemické barvení bylo provedeno za použití Vectastain Elite kitu (Vector, Burlingame, CA). Použitou primární protilátkou byla anti-p53 protilátka PAb1801, a sekundární protilátkou byl avidinem značený anti-myší IgG (Vector). Biotinylovaná křenová proxidasa ABC komplexní činidlo bylo použito pro detekci komplexu antigen-protilátka. Preadsorpční pokusy byly provedeny v každém pokusu imunobarvení. Buňky byly kontrastně barveny Harrisovým hematoxylinem (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Test buněčného růstu. Buňky byly umístěny v hustotě 2 x 10^4

22.07.98

buněk/ml v 6-jamkových plotnách trojitě. Buňky byly infikovány buď přirozeným (Ad5CMV-p53), nebo replikace deficientním adenovirem jako kontrolou. Buňky byly sklízeny každý druhý den, byly počítány a vylučováním trypanové modři byla určena jejich životaschopnost.

Inhibice nádorového růstu in vivo. Účinek Ad5CMV-p53 na vyvinuté podkožní nádorové uzly byl určen u holých myší v definovaném prostředí bez patogenů. Pokusy byly posouzeny a schváleny výbory pro použití a ochranu zvířat a pro výzkum rekombinantní DNA. Stručně řečeno byly po indukci anestezie acepromazinem/ketaminem u každého zvířete vytvořeny tři oddělené podkožní řasy a do každé řasy bylo za použití tupé jehly subkutáně injikováno 5 x 10^6 buněk ve 150 ml kompletního media; buňky byly uzavřeny v řase horizontálním matracovým stehem. Pro každou buněčnou linii byla použita čtyři zvířata. Po 4 dnech byla zvířata znovu podrobena anestezii a řasy byly znovu otevřeny pro podání 100 ml 1) Ad5CMV-p53 (50 MOI) do pravého předního cípu; 2) replikace deficientního viru (50 MOI) do levého zadního cípu; a 3) transportního media samotného do levého zadního cípu. Ve všech místech podání injekce byly před podáním léčby rozvinuté viditelné a podkožně hmatatelné uzly. Zvířata byla denně pozorována a usmrcena v den 20. In vivo objem nádoru byl počítán za uvažování sferického tvaru tumoru s průměrným průměrem tumoru počítaným jako druhá odmocnina součinu průměrů příčných řezů. Po usmrcení byly nádory trojrozměrně měřeny mikrokaliperem pro určení objemu nádoru. Pro testování významnosti rozdílů mezi průměry vzorků byl použit Non-parametrický Friedmanův 2-cestný ANOVA test; byl použit SPSS/PC + softwarový balíček (SPSS Inc., Chicago, Il).

22.07.98

Výsledky

Adenovirová infekce SCCHN buněk. Podmínky pro optimální adenovirový přenos Tu-138 a Tu-177 buněk byly určeny infikováním těchto buněk adenovirem exprimujícím E.coli β-gal gen. Účinnost přenosu byla hodnocena podle počtu modrých buněk po barvení X-gal. Zdálo se, že existuje lineární vztah mezi počtem infikovaných buněk a počtem použitých adenovirových částic. Buňky inokulované jedinou dávkou 100 MOI β-gal adenoviru vykazovaly 60% modrých buněk (obr. 1), a při opakované infekci se toto zvýšilo na 100%. Účinnost přenosu tohoto vektoru u SCCHN buněk je zcela odlišná od účinnosti u jiných buněčných linií, které byly vyšetřovány dříve: HeLa, HepG2, LM2 a buněčné linie lidského nemalobuněčného karcinomu plic vykazovaly po inkubaci s 30 až 50 MOI β-gal adenoviru 97% až 100% infekční účinnost (Zhang et al., 1994).

Exprese exogenní p53 mRNA v adenovirem infikovaných SCCHN buňkách. Pro tuto studii byly vybrány dvě lidské SCCHN buněčné linie: obě buněčné linie Tu-138 a Tu-177 mají mutovaný p53 gen. Pro infekci Tu-138 a Tu-177 buněk byl použit nově vytvořený rekombinantní adenovirus s přirozeným p53, Ad5CMV-p53. Dvacet čtyři hodin po infekci byla izolována celková RNA a byla provedena Northern blot analýza. Transformovaná primární lidská embryonální ledviná buněčná linie 293 byla použita jako pozitivní kontrola vzhledem k vysoké hladině exprese p53 genového produktu, zatímco K562, lymfoblastomová buněčná linie s homozygotní delecí p53 genu, byla použita jako negativní kontrola. Hladiny 2,8 kb endogenní p53 mRNA detekované ve vzorcích izolovaných z falešně infikovaných buněk a z buněk infikovaných replikace-deficientním adenovirem, dl312, byly podobné. Až 10-krát vyšší hladiny

22.07.98

exogenní 1,9 kb p53 mRNA byly přítomné v buňkách infikovaných Ad5CMV-p53, což naznačuje, že exogenní p53 cDNA byla úspěšně přenesena do těchto buněk a že je účinně transkribována. Je zajímavé, že hladina endogenní p53 mRNA byla v těchto buňkách 5-krát vyšší než v pokusných kontrolách. Northern blot analýza nepřinesla důkazy Ad5CMV-p53 (DNA) kontaminace RNA.

Exprese p53 proteinu v adenovirem infikovaných SCCHN buňkách. Western blot analýza byla provedena pro srovnání hladin p53 mRNA a množství produkovaného p53 proteinového produktu. p53 proužek, rozpoznaný monospecifickou anti-p53 protilátkou PAb1801, byl pozorován v buněčných extraktech izolovaných ze všech vzorků kromě K562 buněk. Buněčná linie 293 vykazovala vysoké hladiny p53 proteinu. Vzorky izolované z falešně infikovaných Tu-138 a Tu-177 buněk vykazovaly nízké hladiny p53 proteinu. Hladina exprese p53 zůstávala podobná v buňkách infikovaných dl312 adenovirem. Hladiny p53 antigenu detekované v buňkách infikovaných Ad5CMV-p53 byly signifikantně vyšší než hladiny endogenně mutovaných proteinů v obou buněčných liniích. Tento výsledek ukazuje, že exogenní p53 mRNA produkovaná z buněk infikovaných Ad5CMV-p53 je účinně translatována na imunoreaktivní p53 protein. Kromě toho, imunohistochemická analýza buněk infikovaných Ad5CMV-p53 ukázala charakteristické jaderné barvení p53 proteinu, zatímco u falešně infikovaných buněk nebylo podobné barvení prokázáno i přes přítomnost p53 proteinu v těchto buňkách. Tato neschopnost detekovat protein může být přisouzena nízké sensitivitě testu.

Účinek exogenního p53 na růst SCCHN buněk in vitro. Buňky infikované kontrolním virem dl312 měly růst podobný jako falešně infikované buňky (obrázky 2A a 2B), zatímco růst Ad5CMV-p53 infikovaných Tu-138 (obrázek 2A) a Tu-177 (obrázek 2B) buněk byl

22.07.98

značně potlačen. Dvacet čtyři hodin po infekci se vyskytovaly zřetelné morfologické změny, kdy se část buněčné populace zaoblovala a jejich zevní membrány vytvářely bublinky. Toto je součást histologicky pravděpodobných dějů, které vytvářejí programovanou buněčnou smrt. Účinek byl výraznější u Tu-138 než u Tu-177. Buňky infikované replikace-deficientním adenovirem dl312 vykazovaly normální růstové charakteristiky bez histomorfologických abnormalit. Testy růstu byly reprodukovatelné ve čtyřech opakovaných pokusech.

Inhibice nádorového růstu in vivo. Pro každou buněčnou linii byla testována čtyři zvířata. Jedno zvíře ve skupině Tu-177 zemřelo po chirurgickém zákroku na druhém cípu a provedení terapeutické intervence, pravděpodobně v důsledku prohloubené anestesie a následného napadání společně ustájenými zvířaty. Nekropsie ukázala nepřítomnost metastas nebo systemových účinků. Měřitelné nádory byly zřetelné v obou zadních cípech zvířat (t.j. místech, kde nebyl podán Ad5CMV-p53). Chybění progrese nádoru bylo signifikantní v pravém předním cípu u zvířat, kde byl podán Ad5CMV-p53 ($p < 0,04$). Pomalejší růst Tu-177 buněk byl předem stanoven u těchto zvířat. Dvě zvířata ve skupině Tu-138 byla usmrcena předčasně, protože se u nich vyskytl rychlý růst a ulcerace v oblasti míst kontrolních nádorů. Ve všech místech chirurgických zákroků vznikly před intervencí léze o objemu alespoň 9 mm^3. Objemy nádorů při nekropsii jsou uvedeny v tabulce 4. Rozdíly v objemu nebyly statisticky významné ve skupině Tu-177, což může odrážet omezenou velikost vzorku.

Tabulka 4

Účinek Ad5CMV-p53 na růst nádorů u holých myší [a]

22.07.98

Léčba	Průměrný objem (mm^3 ± SEM)	
	Tu-138 (4)	Tu-177 (3)
Ad5CMV-p53	36,0 ± 23,5	19 ± 14,9
Ad5(dl312)	1187,5 ± 419,0	226 ± 84,0
Medium	1909,3 ± 776,8	454 ± 276,8
Významnost	p hodnota	p hodnota
p53[b]: dl312	0,04	0,09
p53 : medium	0,05	0,09

[a] Buňky byly injikovány podkožně v dávce 5 x 10^6 buněk/cíp. Velikosti nádorů byly určeny v den 20 po léčbě. Čísla v závorkách ukazují počet hodnocených zvířat.

[b] Ad5CMV-p53 je uveden zkratkou p53; dl312 je zkratka pro Ad5(dl312)

Příklad 2

In vivo molekulární terapie p53 adenovirem pro léčbu mikroskopického zbytkového spinocelulárního karcinomu hlavy a krku.

22.07.98

Materiál a metody

Buněčné linie a kultivační podmínky. Lidské SCCHN buněčné linie Tu-138, Tu-177, MDA 686-LN a MDA 886 byly všechny získány jak bylo charakterizováno dříve (Clayman et al., 1993; Sacks et al., 1988). Tyto buňky byly kultivovány v Dulbeccově modifikovaném Eaglově mediu (DMEM/F12) doplněném 10% teplem inaktivovaným fetálním hovězím sérem (FBS) a penicilin/streptomycinem.

Příprava rekombinantního adenoviru a infekce; test buněčného růstu; Western blot analýza. Všechny tyto postupy byly popsány v příkladu 1 výše. Testy růstu buněk byly provedeny trojnásobně.

In vivo transdukce ß-galaktosidasovým adenovirem. X-gal barvení vzorků tkáně bylo provedeno na O.C.T. zmrazených tkáňových řezech pro určení účinnosti přenosu. 8 mikrometrů silné vzorky byly promyty chladným PBS a byly fixovány v 0,5% glutaraldehydu při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Blány byly potom promyty dvakrát 4 °C PBS a inkubovány po dobu 4 hodin v roztoku X-gal (1,3 mM $MgCl_2$; 15 mM NaCl; 44 mM Hepes pufr pH 7,4; 3 mM ferikyanid draselný; 3 mM ferokyanid draselný; 2% X-gal v DMF). Blány byly kontrastně barveny hematoxylinem a eosinem.

Imunohistochemická analýza. Formalinem fixované do parafinu ponořené in vivo zvířecí pokusné tkáně byly nařezány při 4 - 5 μm, sušeny při 60 °C, deparafinizovány a hydratovány destilovanou vodou. Řezy byly potom ošetřeny 0,5% saponinem v destilované vodě a byly propláchnuty několika výměnami destilované vody; endogenní peroxidasová aktivita byla blokována 3% peroxidem vodíku v

methanolu, po čemž následovalo vypláchnutí v několika výměnách destilované vody. Řezy byly ozářeny mikrovlnami v destilované vodě po dobu 3 minut za použití Sharp Model R9H81 mikrovlnné trouby pracující při frekvenci 2450 MHz při 700 W. Po ochlazení byly řezy promyty v několika výměnách destilované vody a umístěny v PBS; imunochemické studie byly provedeny za použití metody avidin-biotin-peroxidasa komplexu (ABC) podle Hsu et al., (1981) následujícím způsobem: řezy byly blokovány normálním koňským sérem a inkubovány přes noc při 4 °C s králičí anti-lidský p53 polyklonální protilátkou, klon OM-1, 1:80 (Signet Laboratories, Denham, MA). Anti-králičí IgE Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) byl potom použit pro aplikaci biotinylovaného králičího IgG a ABC komplexů, které byly každý inkubovány po dobu 45 minut. Imunobarvící reakce byla vizualizována použitím 0,5% DAB v PBS obsahujícím 0,01% peroxid vodíku (pH 7,6), kontrastně barveny 0,01% toluidinovou modří, dehydratována, projasněna a umístěna v Permount. Pro ověření specificity imunobarvení bylo provedeno barvení imunoperoxidasou, za použití stejné metody jako pro testované vzorky, na známý pozitivní cytospin tkáňové kultury buněčné linie spinocelulárního karcinomu, stejně jako na kontrolní negativní králičí monoklonální protilátku.

Inhibice buněčného růstu in vivo. Postup byl proveden stejně jako v příkladu 1. Všechna místa chirurgického zákroku byla hodnocena patologicky, stejně jako byla provedena nekroptická analýza na systemovou toxicitu.

Výsledky

Účinek exogenního p53 na růst SCCHN buněk in vitro. Příklad 1

popisuje in vitro inhibici buněčného růstu v SCCHN buněčných liniích s endogenně mutovaným p53 způsobenou Ad5CMV-p53. Tento příklad určuje, zda SCCHN buněčné linie s endogenním přirozený p53 budou podobně ovlivněny. Také byl zkoumán účinek Ad5CMV-p53 na nemaligní fibroblasty.

Pro tuto studii byly vybrány čtyři lidské SCCHN buněčné linie: Tu-138 a Tu-177 mající mutovaný p53 gen, zatímco MDA 686-LN a 886 jsou obě homozygotní pro přirozený p53 gen. Fibroblastová buněčná linie byla odvozena od normálních fibroblastů, které jsou karytypicky normální a netumorogenní, a byla použita jako nemaligní kontrolní buněčná linie. Buňky infikované kontrolním virem, dl312, měly růst podobný falešně infikovaným buňkám, zatímco růst nádorových buněk infikovaných Ad5CMV-p53 byl významně potlačen (obrázek 3A, 3B, 3C a 3D). Dvacet čtyři až čtyřicet osm hodin po injekci probíhaly ve všech nádorových buňkách zřetelné morfologické změny, kdy se část populace buněk zaokrouhlovala a jejich zevní membrány vytvářely bublinky. Toto je část serie histologicky předvídatelných dějů, které tvoří programovanou buněčnou smrt. Účinek se vyskytl dříve u buněk s endogenně mutovaným p53 než u buněk s přirozeným p53. Buňky infikované replikace - deficientním adenovirem dl312 vykazovaly normální růstové charakteristiky bez histomorfologických abnormalit. Testy růstu byly reprodukovatelné ve čtyřech opakovaných pokusech.

Exprese exogenního p53 proteinu v adenovirem infikovaných normálních fibroblastech a její účinek na stupeň růstu. Dále byl také zkoumán účinek Ad5CMV-p53 na karyotipicky normální a netumorogenní fibroblastovou buněčnou linii. Tyto buňky byly izolovány v průběhu ustanovování primárních nádorových buněčných linií. Dvacet čtyři hodin po infekci byla provedena Wesetern blot

analýza pro srovnání hladin proteinu produkovaného různými typy infikovaných buněk. p53 proužek, rozpoznávaný monospecifickou anti-p53 protilátkou PAb1801, byl pozorován v buněčných extraktech izolovaných ze všech vzorků infikovaných Ad5CMV-p53. Jako v příkladu 1, buněčná linie Tu-138 infikovaná p53 adenovirem vykazovala vysoké hladiny p53 proteinu po transdukci a sloužila jako kontrola. Hladina p53 exprese zůstávala podobná jak ve falešně infikovaných, tak ve dl312 buňkách. Ad5CMV-p53 infikované fibroblasty vykazovaly vyšší hladiny p53 proteinu než kontrolní buňky. Tento výsledek naznačuje, že p53 gen byl účinně přenesen do normálních fibroblastů infikovaných Ad5CMV-p53, jak to dokazuje produkce imunoreaktivního p53 proteinu. Exprese proteinu a účinnost přenosu cytospinů Ad5CMV-p53 infikovaných fibroblastů byla ověřena imunohistochemickou analýzou. Tato fibroblastová buněčná linie vykazovala normální stupeň růstu a morfologii, nezávisle na intervenci (falešná, replikace-deficientní virus nebo Ad5CMV-p53) (obrázek 4). Tyto pokusy byly opakovány dvakrát a také byly ověřeny na jiných buněčných liniích normálních lidských fibroblastů.

In vivo účinnost přenosu. Pro měření účinnosti genového přenosu in vivo bylo podkožní místo řasy resekováno 72 hodin po molekulární nebo kontrolní intervenci. Pokusy závislosti dávka-odpověď s adenovirovým ß-galaktosidasovým markerovým vektorem ukázaly na dávce závislou účinnost přenosu v tomto modelu. Toto bylo potvrzeno imunohistochemickou analýzou 4. den po infekci Ad5CMV-p53. Obě skupiny pokusů ukázaly in vivo odpověď na dávku, která byla dříve popsána in vitro (příklad 1). V žádném případě dávky viru přesahující 10^{10} PFU nezpůsobily expresi p53 v jiných orgánových systemech, včetně mozku, jater, plic, srdce, břišních viscerálních orgánů, a kůže. Tyto pokusy ilustrují vztahy mezi

dávkou a odpovědí mezi titrem viru a účinností přenosu, stejně jako možnost rozsáhlé přechodné exprese přeneseného genu ve zvoleném chirurgickém poli.

Potlačení nádorového růstu in vivo. Studie byla navržena pro určení toho, zda in vivo Ad5CMV-p53 zprostředkovaný genový přenos bude ovlivňovat přihojení nebo růst SCCHN buněk implantovaných do podkožní řasy. Pro dosažení tohoto cíle byl vytvořen model mikroskopické zbytkové nemoci. V tomto modelu byly vytvořeny tři podkožní řasy u samic athymických myší a $2,5 \times 10^6$ nádorových buněk bylo implantováno pipetou. Místo umožnění tvorby uzlů nádorovými buňkami (která se obyčejně vyskytuje v den 4) byla provedena jedna dávka molekulární intervence 48 hodin po implantaci nádorových buněk. Při tomto způsobu, i když nebyly přítomny velké nádory, byly v místě chirurgického zákroku přítomné mikroskopické nádorové buňky, které napodobovaly klinické dilema chirurgické excise všech velkých nádorů. Vývoj nádorů byl v přímém vztahu k počtu nádorových buněk, době určené pro implantaci a dávce Ad5CMV-p53. Z myší, které dostaly mikroskopicky implantované nádorové buňky ($2,5 \times 10^6$) a které byly léčeny Ad5CMV-p53 v dávce 10^8 plaky tvořících jednotek (PFU) nebo vyšší, se pouze u dvou vyvinuly nádory, oba u implantace buněčné linie s přirozeným p53 (MDA 886-LN). Všechny ostatní buněčné linie vykazovaly absenci vývoje nádoru (tabulka 5). Tyto pokusy jasně ukazují, že růst mikroskopických nádorových buněk může být účinně potlačen in vivo, pokud jsou vystaveny Ad5CMV-p53. Tvorba nádoru byla hodnocena na konci 12-ti týdeního období (dříve byla zvířata usmrcena v případě excesivního nádorového vzplanutí) makroskopickou a histologickou analýzou míst chirurgického zákroku. Data vývoje nádorů jsou shrnuta v tabulce 5.

Tabulka 5

Účinek Ad5CMV-p53 na tumorigenicitu v modelu mikroskopického zbytkového onemocnění SCCHN

Buněčná linie	Léčba Počet myší s vyvíjejícím se tumorem/ celkový počet		
	Vehikulum		
	PBS	dl312	Ad5CMV-p53
Tu-138 (homozygotní mutace p53)	8/8	8/8	0/8
Tu-177 (homozygotní mutace p53)	8/8	8/8	0/8
686-LN (homozygotní přirozený p53)	5/8	5/8	0/8
886 (homozygotní přirozený p53)	6/6	6/6	2/6

Imunohistochemická analýza byla provedena na řezech nádorem pokusných zvířat. Tato buněčná linie měla přirozený endogenní p53 gen. Bylo zde chybění významného bazálního barvení životaschopného nádoru MDA 686-LN (falešná infekce). 10^7 PFU Ad5CMV-p53 vykazovalo periferní nekrosu nádoru s imunobarvením v centrálnější části nádoru. 10^8 PFU Ad5CMV-p53 ukázalo úplnou nekrosu nádoru s imunobarvením nalezeným v celé chirurgické kapse s mnohými vrstvami exprivujícími protein včetně stromatu a povrchových svalových vrstev. 10^9 PFU Ad5CMV-p53 vykazovalo podobné výsledky jako 10^8 PFU Ad5CMV-p53, nicméně zvýšená exogenní exprese p53 v místě chirurgického zákroku a edem jsou výraznější.

Při použití zvířat, která sloužila jako vlastní vnitřní kontrola, zvyšovala implantace 4,0 x 10^6 nebo více buněk signifikantně uchycení podkožních implantátů ve srovnání s nádorovou implantací 2,5 x 10^6 buněk ($p < 0,01$), i když byla léčena v místě chirurgického zákroku Ad5CMV-p53 48 hodin po inokulaci. Umožnění uchycení implantovaných buněk po dobu 72 nebo 96 hodin před intervencí s Ad5CMV-p53 podobně zvyšovalo růst nádoru. Pokusy dávka-odpověď určily, že 10^8 a 10^9 PFU Ad5CMV-p53 bylo stejně účinné v inhibici vzplanutí nádoru 2,5 x 10^6 buněk implantovaných po dobu 48 hodin (obrázek 6). Endogenní p53 stav implantovaných nádorových buněčných linií (ať homozygotně mutovaných nebo přirozených p53) měl malý vliv na účinnost Ad5CMV-p53 ve zpomalení vývoje nádoru.

Příklad 3

Indukce apoptosy zprostředkovaná adenovirovým přenosem přirozeného p53 genu u spinocelulárního karcinomu hlavy a krku

Materiál a metody

Buněčné linie a kultivační podmínky; příprava rekombinantního adenoviru a infekce. Všechny postupy byly provedeny a buněčné linie byly kultivovány stejně jak bylo popsáno dříve v příkladech 1 a 2.

Analýza fragmentace DNA. Po inkubaci s adnovirem s přirozeným p53, stejně jako s replikace deficientními adenovirovými kontrolami v různých časových intervalech byly buňky sklízeny, resuspendovány v 300 μl PBS s přidáním 3 ml extrakčního pufru (10 mM Tris, pH 8,0, 0,1 M EDTA, 20 μg/ml RNAsy, 0,5% SDS) a byly inkubovány při 37 °C po dobu 1-2 hodin. Na konci inkubace byla

přidána proteinasa K v konečné koncentraci 100 μg/ml a roztok byl umístěn v 50 °C vodní lázni po dobu nejméně 3 hodin. DNA byla extrahována jednou stejným objemem 0,5 M Tris (pH 8,0) nasyceným fenolem a potom byla extrakce opakována fenol/chloroformem. Precipitovaná DNA byla analyzována v 1% agarosovém gelu.

Fixace buněk. Pro TUNEL metodu byly buňky fixovány v 1% formaldehydu v PBS (pH 7,4) po dobu 30 minut na ledu. Buňky byly potom promyty 3 ml PBS, resuspendovány v 70% ledovém ethanolu a uskladněny při -20 °C do použití. Pro analýzu buněčného cyklu byly buňky fixovány pouze v 70% ledovém ethanolu.

Terminální deoxynukleotidyl transferasový test. Test byl proveden podle postupu dle Gorczyca et al, 1993). Stručně, po fixaci a promytí byly buňky resuspendovány v 50 μl TdT pufru obsahujícím 0,2 M kakodylat sodný (pH 7,0), 2,5 mM Tris-HCl, 2,5 mM C_oCl_2 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), 0,1 mM DTT (Sigma Chemical Company), 0,25 mg/ml BSA (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), 5 jednotek terminální transferasy (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN), a 0,5 nmol biotin-16-dUTP spolu s dATP, dGTP a dCTP v koncentraci 20 μM. Kontroly byly připraveny inkubací separátních aliquot každého testovaného vzorku bez dUTP. Buňky byly inkubovány v roztoku při 30 °C po dobu 30 minut, vypláchnuty v PBS, a resuspendovány ve 100 μl FITC, barvícím roztoku obsahujícím 4X SSC, 0,1% Triton X-100 a 2,5 μg/ml fluorescenčního avidinu (Vector, Labs. Inc., Burlingame, CA). Tuby byly inkubovány po dobu 30 minut ve tmě při pokojové teplotě. Buňky byly vypláchnuty v PBS s 0,1% Triton X-100 a resuspendovány v 0,5 ml PBS obsahujících propidiumjodid (5 μg/ml) a 70 μl (1 mg/ml) RNAsy. Tuby byly inkubovány ve tmě na ledu po dobu 30 minut před provedením analýzy průtokovou

22.07.98

cytometrií.

Analýza průtokovou cytometrií. Všechny vzorky byly analyzovány za použití EPICS Profile II průtokového cytometru (Coulter Corp., Hialeah, FL) se standartní optickou konfigurací. Pro jeden vzorek bylo získáno alespoň 5000 dějů. Pozitivita na TdT koncové značení byla určena odečtením kontrolního histogramu od testovaného histogramu za použití immuno-4 programu z Elite workstation softwaru (Coulter Corp., Hialeah, FL).

Test buněčného růstu. Buňky byly umístěny na plotny a růst byl monitorován jak je popsáno v příkladu 1.

In vivo analýza apoptosy. Genová terapie v modelu mikroskopického zbytkového onemocnění SCCHN byla popsána výše v příkladu 2.

In situ koncové značení. Postup byl proveden jak bylo popsáno dříve (Wijsman et al., 1993). Stručně, parafinové řezy byly zbaveny vosku v xylenu po dobu 5 minut třikrát, a byly progresivně hydratovány ponořením sklíček po každé na dobu 3 minut do 100%, 90%, 70% a 30% roztoku ethanolu. Endogenní peroxidasa byla inaktivována ponořením sklíček na dobu 20 minut do 0,75% H_2O_2 objem/objem ve 100% methanolu. Po promytí sklíček v PBS byly řezy tráveny 0,1% pepsinem (Fisher Scientifics, Houston, TX) hmotnost/objem v 0,1 N HCl po dobu 5 minut při 37 °C a byly důkladně promyty v PBS. Řezy byly potom inkubovány ve vlhké komůrce při 37 °C po dobu 1 hodiny se směsí pro koncové značení obsahující následující složky: terminální deoxynukleotidyl transferasu 0,5 jednotek/μl; biotinylovaný dUTP, 0,06 mM; 5X tdt pufr, 10 μl; dvakrát destilovanou vodu do 50 μl. Reakce byla

ukončena ponořením sklíček do pufru obsahujícího 300 mM NaCl a 30 mM citratu sodného ve dvakrát destilované vodě. Po promytí sklíček v PBS byly řezy inkubovány s avidinem konjugovaným s křenovou peroxidasou po dobu 1 hodiny při 37 °C ve vlhké komůrce. Barvení bylo vyvíjeno za použití 3,3'-diaminobenzidinu a řezy byly kontrastně barveny methylovou zelení.

Výsledky

Potlačení růstu SCCHN buněčných linií p53 adenovirem. Příklady uvedené výše ukazují, že přirozený typ p53 genu může být účinně přenesen do SCCHN buněčných linií rekombinantním adenovirovým vektorem. V důsledku toho ztrácejí postižené nádorové buňky svou schopnost proliferace in vitro stejně jako in vivo. Účinek suprese je nezávislý na endogenním p53 stavu buněčné linie. Předešlé analýzy stupně růstu byly provedeny během týdeního období. Předkládaný příklad zkoumá časné účinky přirozeného typu p53 na růst SCCHN buněk (t.j. časné časové intervaly, hodiny).

V této studii byly použity dvě representativní buněčné linie. Buněčná linie Tu-138 nese mutovaný p53 gen, zatímco buněčná linie MDA 686LN nese přirozený p53 gen. Buňky infikované replikace-deficientním virem dl312 měly stupeň růstu podobný jako falešně infikované buňky (obrázek 5A a obrázek 5B). Na druhé straně, růst Ad5CMV-p53 infikovaných Tu138 (obrázek 5A) a MDA 686LN (obrázek 5B) buněk byl signifikantně potlačen. Zdá se, že exogenní p53 protein způsoboval časnější a silnější potlačení růstu u Tu138 buněk ve srovnání s MDA 686LN. Byly pozorovány zřetelné morfologické změny, kdy u části buněčné populace docházelo k zaoblování a jejich zevní membrány vytvářely bublinky, což ukazuje na apoptosu, která probíhala současně

s iniciací růstové suprese. Buňky infikované replikace-deficientním adenovirem, dl312, vykazovaly normální růstové charakteristiky bez histopatologických abnormalit. Významné je, že účinky nebyly pozorovány po p53 adenovirové infekci karyotypicky normálních fibroblastů, jak je uvedeno podrobně v příkladu 2 výše, stejně jako lidských orálních keratinocytů (imortalizovaných, ale netumorogenních).

Fragmentační analýza DNA. Jedním z charakteristických znaků apoptosy, který ji odlišuje od nekrosy, je biochemicky pozorovatelné objevení žebříčkových DNA fragmentů. Pro potvrzení toho, že buňky podléhají apoptose po infekci p53 adenovirem byla provedena fragmentační analýza DNA. Chromosomální DNA extrahovaná z životaschopných buněk po infekci replikace-deficientním adenovirem a adenovirem s přirozeným p53 byla podrobena elektroforese na agarosovém gelu. Výskyt DNA fragmentů ekvivalentních asi 200 bp a jejich násobků byl zjištěn ve všech buněčných liniích. Fragmentovaná DNA se objevila 22 hodin po infekci p53 adenovirem v Tu-138 buněčné linii, zatímco v MDA 686LN buněčné linii byla fragmentovaná DNA prokazatelná za 30 hodin a zřetelněji za 48 hodin po infekci adenovirem s přirozeným p53. Žádná fragmentovaná DNA nebyla detekovatelná u falešně infikovaných a dl312 infikovaných buněk.

In vitro terminální deoxynukleotidyl transferasový test. Jiným charakteristickým znakem apoptosy je morfologická změna a destrukce strukturální organizace jádra, která vede ke kondenzaci chromatinu. Pro detekci takových ultra-strukturálních změn byla rozsáhle používána elektronová mikroskopie. Nicméně, nyní převažují pro identifikaci apoptotických buněk metody průtokové cytometrie, vzhledem k možnosti snímat a analyzovat

buněčnou populaci ve srovnání s elektronovou mikroskopií (Gorczyca et al., 1993). Vynálezci zde použili TUNEL (terminální deoxynukleotidyl transferasou zprostředkovaná dUTP-biotin konec se zářezem-značkovací) metodu (Gorczyca et al., 1993), která je založena na detekci rozsáhlých zlomů DNA pro identifikaci apoptotických buněk. 15 hodin po infekci p53 adenovirem bylo 4,4% životaschopné Tu-138 buněčné populace v apoptotických stavech ve srovnání s 0% u MDA 686LN (obrázky 6A a 6B). Počet apoptotických buněk se také proporcionálně zvyšoval s dobou pozorování od p53 adenovirové inkubace. Téměř 31% Tu-138 buněk podléhalo apoptose ve 22 hodině. I přes oddálení počáteční indukce apoptosy bylo asi 60% MDA 686LN buněk v apoptotickém stavu 48 hodin po infekci p53 adenovirem. Pozoruhodné je, že procento apoptotických buněk jak je hodnoceno TUNEL metodou může být významně podhodnoceno, protože analýze jsou podrobeny pouze životaschopné buňky. Tato data dobře korelují se stupněm růstu a fragmentační analýzou DNA. Nebyla prokázána žádná detekovatelná buněčná populace podléhající apoptose v kontrolních pokusech za použití falešné infekce, stejně jako kontroly používající replikace-deficientní virus (100 M.O.I.). Proto, apoptosa není funkcí přeneseného adenovirového genového produktu samotného.

In vivo analýza apoptosy. Příklady uvedené výše ukazují, že p53 adenovirus potlačuje tvorbu nádorů in vivo. Tento příklad byl navržen tak, aby ukázal, zda potlačení růstu nádoru in vivo je způsobeno apoptosou. In situ koncová značkovací analýza byla provedena pro detekci apoptotických buněk v řezech ponořených do parafinu získaných z příkladu 2. Je jasné, že žádné barvení nebylo získáno z tkáňových řezů izolovaných z MDA 686LN nesoucích zvířat, která dostala léčbu PBS jako kontrolu. Na druhé straně, tkáňové řezy izolované z MDA 686LN nesoucích myší léčených

22.07.98

adenovirem s přirozeným p53 vykazovaly vysoce pozitiviní barvení, což ukazuje, že apoptosa byla skutečně dějem účastnícím se potlačení růstu nádoru in vivo.

Kromě těchto studií chtěli vynálezci zjistit, zda potlačení růstu je částečně důsledkem zastavením buněčného cyklu indukovaným proteinem p21, nebo zda je primárně výsledkem apoptosy. Western blotting ukázal, že protein p21 byl indukován v SCCHN buňkách infikovaných adenovirem s přirozeným p53. Nicméně analýza buněčného cyklu ukázala, že i přes zvýšené hladiny p21 proteinu v buňkách infikovaných p53 adenovirem zde nebyla signifikantní akumulace buněk v G_1 stadiu ve srovnání s S fází.

Příklad 4

Potlačení růstu buněk spinocelulárního karcinomu hlavy a krku pomocí p53-FLAG: účinný marker pro pokusy genové terapie

Materiál a metody

Buněčné linie a kultivační podmínky. Příprava rekombinantního adenoviru a infekce; Northern blot analýza; Western vlot analýza; Testy buněčného růstu; Imunochemické barvení buněčných vrstev in vitro. Všechny postupy byly provedeny a buněčné linie byly kultivovány jak je popsáno v příkladu 1.

Tvorba p53-FLAG adenoviru. p53 cDNA sekvence byla excidována z pC53-SN štěpením BamHI a byla klonována do BamHI místa pGEM71. Rekombinantní plasmid se správnou orientací insertu byl potom štěpen Acc1 a Kpn1 pro odstranění 22 aminokyselin ze 3' konce p53 cDNA. Linker s Acc1-Kpn1 kompatibilními konci obsahující sekvenci FLAG peptidu včetně stopkodonu byl pak ligován do štěpeného

plasmidu za vytvoření p53-FLAG fúsního genu. Vzniklý p53-FLAG fúsní gen byl potom klonován do expresního vektoru s lidským CMV promotorem a SV polyadenylačním signálem. Konečný konstrukt byl potom insertován do přepravního vektoru pXCJL.1 (Zhang et al., 1994) za vzniku rekombinantního p53-FLAG adenoviru.

In vivo pokusy s mikroskopickým zbytkovým onemocněním. Pokusy byly provedeny v definovaném prostředí bez patogenů za použití modelového systžemu athymických holých myší popsaného v příkladu 1. Byly provedeny dvě různé sady opakovaných pokusů. První byl pokus dávka-odpověď za použití AdCMV-p53-FLAG viru ve třech řasách s klesajícími koncentracemi (10^{10} pfu, 10^{9} pfu, 10^{8} pfu). Čtvrtá řasa sloužila jako kontrola a byla randomizována na buď PBS nebo na replikace-deficientní adenovirus (dl312). Druhá studie byla provedena za použití 10^{10} pfu AdCMV-p53-FLAG, AdCMV-p53 a replikace-deficientního adenoviru ve třech různých řasách. Čtvrtá řasa byla inokulována stejným objemem (100 μl) sterilního PBS. Čtyřicet osm hodin po léčbě byla dvě z těchto zvířat usmrcena a řasy byly odebrány pro imunohistochemickou analýzu. Zbývající zvířata byla pozorována po dobu 21 dní a potom byla usmrcena. Objemy nádorů byly měřeny pro srovnání za použití kaliperu.

Výsledky

Exprese mRNA po infekci AdCMV-p53 a AdCMV-p53-FLAG viry. Obě Tu-138 a MDA 686LN byly vyšetřovány na expresi p53 mRNA. Celková RNA byla izolována po adenovirové infekci. Byla provedena Norther blot analýza. Podobné hladiny exogenní AdCMV-p53 mRNA byly

22.07.98

pozorovány u buněk infikovaných AdCMV-p53 a AdCMV-p53-FLAG. Hladiny p53 mRNA exprese po infekci AdCMV-p53 a AdCMV-p53-FLAG byly srovnatelné pro Tu-138 a pro MDA 686LN. Variace intenzity byla ve vztahu k počáteční dávce. Endogenní exprese p53 mRNA je pozorována v liniích 2 a 3 u buněčné linie Tu-138 s mutovaným p53. Nebyla zde signifikantní exprese endogenní p53 mRNA u MDA 686-LN buněčné linie, která má přirozený p53 gen. Tato data naznačují, že AdCMV-p53-FLAG virus, stejně jako AdCMV-p53 virus, je úspěšně přenesen a účinně transkribován. Northern analýza neukázala důkazy AdCMV-p53 DNA kontaminace.

Exprese exogenního p53 proteinu v SCCHN buněčných liniích infikovaných AdCMV-p53 a AdCMV-p53-FLAG. Western blot analýza byla provedena pro srovnání množství proteinu exprimovaného buňkami infikovanými AdCMV-p53 a AdCMV-p53-FLAG. Proteinové proužky byly identifikovány za použití monospecifické p53 protilátky (PAb1801) a anti-FLAG M2 protilátky (IB13025) ve dvou simultáních bězích gelem. Při použití p53 protilátky (pAB1801) byly zjištěny podobně vysoké hladiny exprese p53 proteinu v obou buněčných liniích, které byly infikovány AdCMV-p53 a AdCMV-p53-FLAG. Tu-138 a MDA 686LN buňky infikované AdCMV-p53 byly také testovány. Žádná změna v expresi proteinu nebyla zaznamenána ani v buňkách infikovaných replikace-deficientním adenovirem, ani ve falešně infikované skupině, když byl podobně zpracovaný gel sondován myší anti-FLAG M2 protilátkou. Hladina exprese p53-FLAG proteinu se zdála být podobná hladině exprivované po sondování p53 protilátkou, ale žádný detekovatelný proužek nebyl zaznamenán v buňkách infikovaných AdCMV-p53 virem. Falešně a dl312 infikované buňky nevykazovaly žádnou detekovatelnou hladinu imunoreaktivního p53 nebo FLAG proteinu v ani jedné buněčné linii.

22.07.98

Účinek AdCMV-p53 a AdCMV-p53-FLAG na SCCHN buněčný růst in vitro. Cytotoxický účinek terapie přirozeným p53 u Tu-138 a MDA 686LN buněčných linií byl podrobně popsán výše. Tu-138 buněčná linie má endogenně mutovaný p53 gen a MDA 686-LN buněčná linie má přirozený p53 gen. Tato studie chce určit, zda bude pozorován jakýkoliv rozdíl v účinnosti po rekombinaci AdCMV-p53 viru po insertování FLAG sekvence.

Buňky infikované replikace-deficientním adenovirem měly podobný stupeň růstu jako falešně infikované buňky. Slabý cytotoxický účinek mohl být pozorován u replikace-deficientního adenoviru (obrázek 7A). Oproti tomu, buňky infikované buď AdCMV-p53, nebo AdCMV-p53-FLAG vykazovaly v podstatě úplnou smrt nádorových buněk v den 3. Histologické vyšetření ukázalo tvorbu vypouklin plasmatické membrány, což je rys charakteristický pro apoptosu a ta byla charakterizována jako mechanismus smrti buněk u SCCHN buněčných linií infikovaných AdCMV-p53 (příklad 1). Jak je uvedeno výše, účinek byl výraznější pro Tu-138 buněčnou linii (mutovaný p53), než pro MDA 686-LN buněčnou linii (přirozený p53). Testy na růstovou křivku byly reprodukovatelné ve třech opakovaných studiích bez významného rozdílu mezi účinkem AdCMV-p53 a AdCMV-p53-FLAG virů, což naznačuje, že přidání FLAG peptidu neovlivňuje schopnost p53 potlačovat růst buněk.

Imunohistochemické barvení SCCHN buněčných linií infikovaných adenovirem. Infikované buněčné monovrstvy byly porovnávány na expresi p53 a p53-FLAG proteinu za použití standartních imunohistochemických technik. Ani p53, ani FLAG protein nemohly být zřetelně identifikovány ve falešně nebo v dl312 infikovaných buňkách MDA 686-LN buněčné linie. Nicméně, u Tu-138, která má

22.07.98

mutovaný p53 gen, bylo endogenní barvení na p53 pozitivní. Když byly buňky infikovány AdCMV-p53 virem, bylo zaznamenáno silné barvení v obou buněčných liniích. Vizuální prohlídka buněk infikovaných AdCMV-p53-FLAG virem ukázala shodnou intensitu barvení a množství buněk pozitivních na PAb1801 protilátku, ve srovnání s buňkami infikovanými AdCMV-p53 virem. Buňky infikované AdCMV-p53-FLAG virem také vykazovaly silnou imunohistochemickou pozitivitu na M2 FLAG protilátku. Kvalita barvení byla různá, jak v jádře, tak v menším stupni v cytoplasmě.

In vivo potlačení růstu. Studie odpovědi na dávku za použití 10^8, 10^9 a 10^{10} plaky tvořících jednotek (pfu) AdCMV-p53-FLAG viru za srovnání s kontrolní řasou, která byla buď PBS, nebo dl312, byly provedeny za použití metody mikroskopického modelu popsané v příkladu 1 na Tu-138 buněčné linii. Průměrná velikost nádoru pro falešnou infekci byla 1205 +/- 205 mm^3. Velikost nádoru se zvyšovala lineárním způsobem se zvyšující se koncentrací viru použitou v molekulární intervenci. Průměrná velikost nádoru byla 637 +/- 113 mm^3, 392 +/- 109 mm^3 a 193 +/- 74 mm^3pro řasy ošetřené 10^8, 10^9 a 10^{10} pfu AdCMV-p53-FLAG, v příslušném pořadí. Každé zvíře bylo srovnáváno proti sobě samému za použití párového t testu a signifikantní účinek dávka-odpověď byl zaznamenán při $p < 0,05$ při všech srovnáních kromě řas ošetřených 10^9 a 10^{10} pfu. Jednoznačně, čím vyšší množství viru, tím větší vizualizované inhibice růstu nádoru. V další studii byly účinky AdCMV-p53 srovnávány s účinky AdCMV-p53-FLAG. Nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl.

Imunohistochemická demonstrace exogenního účinku suprese nádoru ve zvířecím modelu mikroskopického zbytkového onemocnění. Po ověření srovnatelné in vivo a in vitro aktivity AdCMV-p53 a

22.07.98

AdCMV-p53-FLAG použi li vynálezci imunohistochemické techniky pro demonstraci p53-FLAG fusního proteinového produktu in vivo. Za použití Tu-138 a MDA 686-LN buněčných linií byly řasy s mikroskopickým zbytkovým onemocněním odebrány 48 hodin po léčbě, byly fizovány ve formalinu a ponořeny do parafinu. Na sousedící řezy nádorových buněk léčených AdCMV-p53-FLAG virem bylo aplikováno barvení na p53 i na FLAG protein. Intenzita barvení a počet pozitivně se barvících buněk byly přímo úměrné množství viru použitému k infekci. Kontroly byly negativní jak na p53, tak na FLAG protilátky u MDA 686-LN buněk. Endogenní barvení na p53 bylo zaznamenáno u Tu-138 nádorových buněk. Histologické vzorky byly barveny haematoxylinem a eosinem, p53 protilátkou a FLAG protilátkou. Charakteristické cytoplasmatické barvení FLAG M2 protilátkou kontrastovalo s intranukleárním barvením p53 protilátkou. Toto je poprvé, co byla FLAG M2 protilátka odzkoušena jako účinná ve tkáni fixované ponořením do parafinu. Barvení ukázalo, že supresivní účinek na nádor je řízen exogenní terapií a že v in vivo modelu je možné identifikovat exogenní terapii za použití aplikovaného FLAG systemu.

Závěrem, je jasné, že společné podání FLAG proteinu spolu s požadovanou genovou terapií nabízí využití tohoto proteinu jako markeru genové terapie. Vynález jasně ukazuje, že je simultáně aktivován spolu s p53 genem a že exprese messengerové RNA a proteinu nebyla snížena. Významnější je, že biologická aktivita nádorového supresorového genu nebyla změněna. Poprvé byla FLAG protilátka ověřena jako účinná, když byla imunohistochemická analýza provedena na formalinem fixované tkáni ponořené do parafinu. Tyto faktory naznačují použitelnost tohoto nového proteinu jako markeru pro další studie genové terapie.

22.07.98

Příklad 5

Léčba spinocelulárního karcinomu hlavy a krku za použití p53 adenoviru

Pacient A

53letý muž s inoperabilním SCCHN nádorem hlavy. Hmota nádoru má průměr asi 6,5 cm. Po vyšetření funkce kostní dřeně, počtu krevních destiček a funkce ledvin dostal pacient první léčbu 10^8 infekčních částic adenovirového-p53 expresního konstruktu, ředěných ve sterilním fosfátem pufrovaném salinickém roztoku, prostřednictvím osmi různých nitronádorových injekcí (celkový objem 10 ml). Každé tři dny dostal pacient stejnou léčbu, dokud nebylo podáno celkem šest cyklů.

Tři dny po šestém podání byl nádor vyšetřován a bylo zjištěno, že má průměr > 4,0 cm. Histologické vyšetření ukázalo významnou fragmentaci buněk v okrajích nádoru. Byla podána druhá serie šesti léčebných cyklů, po které bylo zjištěno, že nádor má průměr > 2,0 cm a je nekrotický. Pacient pokračoval v léčbě v jednotýdenních aplikacích po dobu tří měsíců, po kterých již nebyl nádor zjevný.

Pacient B

44letá žena s operabilním SCCHN nádorem krku. Hmota tumoru má průměr asi 2,5 cm. Po vyšetření funkce kostní dřeně, počtu krevních destiček a funkce ledvin dostal pacient první léčbu 5 x

22.07.98

10^7 infekčních částic adenovirového - p 53 expresního konstruktu, ředěných ve sterilním fosfátem pufrovaném salinickém roztoku, prostřednictvím třech různých nitronádorových injekcí (celkový objem 3 ml). Každé tři dny dostal pacient stejnou léčbu, dokud nebylo podáno celkem šest cyklů.

Tři dny po šestém cyklu byl nádor excidován. Nádorové lůžko bylo promyto 6 ml sterilního fosfátem pufrovaného salinického roztoku po dobu 60 minut. Inokulum bylo odstraněno, rána byla uzavřena a v nádorovém lůžku byl ponechán dren. V den 4, 7, 10 a 14 po chirurgickém zákroku bylo drenem podáno 5 x 10^7 infekčních částic adenovirového - p 53 expresního konstruktu, ředěných ve sterilním fosfátem pufrovaném salinickém roztoku (celkový objem 3 ml). Po ponechání v lůžku nádoru po dobu 2 hodin bylo inokulum odstraněno odsátím. Šest měsíců po ukončení léčby nebyly pozorovány žádné primární, lokální nebo regionální nádory.

Příklad 6

Přenos přirozeného p53 genu pomocí adenovirového vektoru ve fázi I klinického pokusu s pacienty s pokročilým recidivujícím spinocelulárním karcinomem hlavy a krku

Adenovirový vektor obsahující přirozený p53 gen byl podán v logaritmicky se zvyšujících dávkách pacientům s biopticky potvrzeným recidivujícím karcinomem hlavy a krku. Přímé nitronádorové injekce byly provedeny třikrát týdně po dobu dvou následujících týdnů. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin: 1) resekovatelné recidivující onemocnění, 2) neresekovatelné recidivující onemocnění.

22.07.98

Pacienti přidělení do skupiny resekovatelného onemocnění podstoupili velkou chirurgickou resekci jejich recidivující neoplasie 72 hodin po šestém genovém přenosu v průběhu 2 týdnů. Adenovirový vektor byl také podán intraoperativně a 72 hodin po chirurgickém zákroku infusí retrogradním katetrem. U neresekovatelných pacientů proběhly opakované pokusy o genový přenos pomocí přímých nitronádorových injekcí měsíčně ve dvoutýdeních cyklech, dokud nebyla pozorována progrese onemocnění nebo zhoršení "performace" stavu pacienta. Bezpečnost této léčby byla sledována podrobným pozorováním za hospitalisace, biopsiemi pro hodnocení účinnosti genového přenosu, analýzou tělesných tekutin na vyloučené vektory a nekroptickou analýzou.

Metody

Studované subjekty. 21 pacientů s pokročilými recidivujícími spinocelulárními karcinomy horního aerodigestivního traktu se status performace podle Eastern Cooperative Oncology Group 2 vstoupilo do dvou ramen studie skládajících se z pacientů s resekovatelnou (skupina 1) nebo neresekovatelnou (skupina 2) recidivující malignitou. Charakteristiky studovaných subjektů a dávky adenovirového vektoru jsou ukázány v tabulkách 7 a 8, v příslušném pořadí. Všechny ženy měly negativní těhotenský test a všichni pacienti používali antikoncepční metody. Informovaný souhlas byl získán od všech pacientů před vstupem do studie.

Vektory pro genový přenos. Presentovaná studie používala vektor replikace-deficientního adenoviru serotypu 5 s enhancer (cytomegalovirus)-promotorem označený Ad5CMV-p53. Tři dávky adenovirového vektoru a plaky tvořícími jednotkami (PFU) v rozsahu 10^9 až 10^{11} byly produkovány zkušenými výrobci v

22.07.99

Mangenta, Inc. a Introgen Therapeutics, Inc. a byly rychle zmrazeny (-70 °C) na University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center. Každá dávka byla účinná pro přenos za použití western blottingu, stejně jako za použití in vitro testu potlačení růstu nádorových buněk. Vektor se nechal roztát a ředil se ve fosfátem pufrovaném salinickém roztoku (vehikulum) bezprostředně před přenosem genu a byl transportován na pokoje pacientů při teplotě 4 °C.

22.07.98

Tabulka 6

Charakteristiky pacientů

Pc.č	Věk	Pohlaví	Primární nádor	Patologie	p53 genotyp	Předešlá terapie	Místo přenosu genu	*Rameno studie
1	31	Ž	Ústní patro	středně dif. SCC	MAA	chir., RAT chemo	tvář	1
2	58	M	Larynx	středně dif. SCC	WT	chir., RAT	submentálně nasofarynx	1
3	56	M	Sinus pyriformis	špatně diferencovaný	MAA	chir., RAT	krk vlevo	2
4	42	Ž	Kořen jazyka	špatně dif. SCC	WT	chir., RAT	krk vpravo	2
5	71	M	neznámý	špatně dif. SCC	WT	chir., RAT chemo	krk vlevo	1
6	43	M	krční jícen	špatně dif. SCC	MAA	chir., RAT chemo	peristomálně	2
7	63	M	tonsila	středně dif. SCC	WT	RAT, chemo.	krk vlevo	2
8	46	M	kořen jazyka	středně dif. SCC	MAA	chir., RAT	kořen jazyka	1
9	57	M	larynx	dobře dif. SCC	WTT	chir., RAT	recidiva peristom.	2
10	58	M	larynx	středně dif. SCC	MAA	chir., RAT	hypofarynx	1
11	46	M	kořen jazyka	špatně dif. SCC	MAA	RAT, chemo	kořen jazyka	1
12	57	Ž	ústní patro	středně dif. SCC	WT	chir., RAT	levé retromol. trigonum	2
13	66	M	kořen jazyka	středně dif, SCC	WT	chir., RAT	zadní třetina jazyka a kořen	2
14	48	Ž	patro ústní	špatně dif. SCC	WT	chir., RAT	patro ústní	2
15	63	M	mandibulární alveol. val	středně dif. SCC	WT	chir., RAT chemo	tvář	2
16	76	Ž	larynx	špatně dif. SCC	MAA	RAT	supraklavikula	1
17	56	M	larynx	středně dif. SCC	WT	chir., RAT chemo	kořen jazyka tonsilární fossa	2
18	56	M	levá laterální stěna faryngu	středně dif. SCC	WT	chemo	krk	2
19	53	M	neznámý	špatně dif. SCC	WT	chir., RAT chemo	submentálně	1
20	55	M	jazyk	špatně dif. SCC	WT	chir. RAT chemo	krk	2
21	66	M	kořen jazyka	dobře dif.	WT	chemo., RAT	krk	2

22.07.98

Tabulka 7

Dávkování vektoru a přítomnost nebo absence nukleotidů adenovirového vektoru v séru nebo v moči během léčby

Pacient	PFU/ přenos	Injik. objem	Cykly genového přenosu	Místo injekce
1	10^6	6 cm^3	2	tvář
2	10^6	3 cm^3	2	submentálně, neofaryngx
3	10^6	3 cm^3,4 cm^3	1	krk vlevo
4	10^6	3 cm^3,5 cm^3	1+3	krk vpravo
5	10^6	1,5 cm^3	1	krk vlevo
6	10^6	3 cm^3	1	peristomálně
7	10^7	2 cm^3	4+2	krk vlevo
8	10^7	3 cm^3	1	kořen jazyka
9	10^7	1,5 cm^3	1	peristomální recidiva
10	10^8	1,5 cm^3	1	hypofaryngx
11	10^8	3 cm^3	1	kořen jazyka
12	10^8	1,5 cm^3	3	levé retromolární trigonum
13	10^9	1,5 cm^3	6	pr. zadní mandle a kořen jazyka
14	10^9	1,5 cm^3	1+1	patro dutiny ústní
15	10^9	3 cm^3	1	levá tvář
16	10^9	1,5 cm^3	1	levé supraklavikulární hmoty
17	10^9	1,5 cm^3	1	kořen jazyka, tonsilární fossa
18	10^9	3 cm^3	4	levá tvář
19	$10^{9.5}$	1,5 cm^3	1	submentálně
20	$10^{9.5}$	3 cm^3	3	krk vlevo
21	$10^{9.5}$	1,5 cm^3	3	krk vpravo

Dávkování. Adenovirový expresní vektor byl podán pěti skupinám

pacientů v logaritmicky se zvyšující dávce. Zvýšení dávky bylo určeno po dvoutýdením pozorování posledního pacienta léčeného předešlou dávkou. Po vstupu prvních šesti pacientů do studie vstoupili tři pacienti v dávce nezávislé na tom, do které skupiny - resekovatelné nebo neresekovatelné - byli pacienti přiděleni. Dávka biologického vektoru je popsána ve smyslu celkové dávky (v plaky tvořících jednotkách). Určený počet vektorů podaných na meligní epiteliální buňku neby přibližně určován. Celkový objem podané dávky je ukázán v tabulce 7. Objem adenovirového vektoru injikovaného do solidních malignit byl určen klinickým a radiografickým hodnocením objemu nádoru. Vektor byl přímo injikován do recidivujících spinocelulárních karcinomů pod zrakovou kontrolou a pod palpační kontrolou. Injekce byly podány s mezerami 1 cm do hmoty nádoru. Po přenosu genu byl subjekt podrobně pozorován po dosu nejméně 1-1/2 hodiny. Respirační izolace a izolace tělesných sekretů byla dodržována po dobu 72 hodin po posledním genovém přenosu vektoru.

Detekce vektoru. Vzorky séra a moči byly sledovány na disseminovaný adenovirový vektor za použití kultury 293 buněk, stejně jako za použití polymerasové řetězové reakce (PCR) využívající primery, které amplifikují E1b region adenoviru a 5' konec přirozeného p53 genu, které jsou specifické pro vektor. PCR produkty byly potom přeneseny Southern metodou pro zlepšení detekce viru na 1-5 virových částic, stejně jako pro ověření specificity PCR produktu. V každé reakci byly testovány pozitivní a negativní kontroly.

Bezpečnost. Byly sledovány příznaky, vitální projevy, hodnoty krevního obrazu a pacienti byli fyzikálně vyšetřováni a byla prováděna fotografická dokumentace jednou denně. RTG snímek plic,

22.07.98

biochemické vyšetření krve a analýza performance stavu byly prováděny na počátku každého cyklu léčby. Sérové titry adenovirové protilátky byly měřeny před a po každém cyklu genového přenosu. Tři dny po šestém genovém přenosu prvního cyklu byly získány biopsie nádoru (nebo chirurgické excise). Vzorky byly uskladněny jako rychle zmrazené, patologicky ponořené vzorky, stejně jako vzorky fixované ve formalinu v každém případě.

Extrakce nukleových kyselin ze séra nebo moči. Ad5CMV-p53 adenovirová DNA byla extrahována z 0,5 ml aliquot séra a moči modifikovanou metodou podle Cunninghama et al., (1995). Stručně, byla přidána destilovaná voda do 1 ml a bylo provedeno srážení 30% polyethylenglykolem (PEG). Protože SDS samotná není dostatečná pro uvolnění virové DNA z částice, byla přidána proteinasa K k SDS při 50 °C po dobu 2 - 16 hodin po PEG srážení (Norder et al., 1990). Vzorky byly extrahovány fenolem a virová DNA byla srážena ethanolem za přítomnosti glykogenu (Cunningham et al., 1995). Sražená DNA byla znovu získána centrifugací při 14000 g po dobu 10 minut při 4 °C, byla resuspendována v 0,3 ml destilované vody a byla reprecipitována ethanolem. DNA peleta byla vypláchnuta 70% ethanolem, sušena vakuem a rozpuštěna v 10 μl destilované vody. Vzorky byly analyzovány buď ihned, nebo byly uskladněny při -20 °C do použití. Extrakce nukleových kyselin byla provedena biologicky bezpečných digestořích pro zabránění možné zkřížené kontaminaci vzorků.

PCR reakce na DNA izolované ze vzorků séra. Byly navrženy primery pro specifickou amplifikaci p53 genu z adenovirového vektoru. Horní primer (5'-CACTGCCCAACAACACCA-3', SEQ ID NO: 5) odpovídá 3' konci p53 genu a dolní primer

(5'-GCCACGCCCACACATTT-3', SEQ ID NO: 6) odpovídá E1B regionu adenoviru typu 5 (nukleotidy 3517 až 3533 přirozené sekvence). Každá tuba pro PCR reakci obsahovala 0,2 mM každého oligonukleotidu, 0,4 mM dNTP, 1X TaqPlus Long pufru s nízkým obsahem solí (od Stratagene), 0,6 μl TaqPlus Long (5 U/ml) (od Stratagene) a 5 μl testované DNA. Vzorky byly umístěny v MJ Research Peltier Thermal Cycler (PTC-200) programovaného pro 93 °C po dobu 3 minut, s profilem následujících tří kroků: 93 °C po dobu 30 sekund, 65 °C po dobu 45 sekund a 72 °C po dobu 45 sekund celkem 30 nebo 35 cyklů. 5 μl 6X plnícího pufru (0,25 % bromfenolová modř, 0,25% xylen cyanol FF a 15% Ficoll (Typ 400; Pharmacia) ve vodě) byl přidán do každé tuby na konci běhu PCR a byl zaveden na 1% agarosu, 1X TBE gel obsahující ethidium bromid (6 μg/ml). Vzorky byly podrobeny elektroforese při 100 V po dobu 1 - 1,5 hodiny a potom byly fotografovány pod UV světlem.

Polymerasová řetězová reakce. Pouze 5 μl připravené DNA mohlo být použito v jedné polymerasové řetězové reakci. Pro sérum byla PCR provedena ve 20 μl objemu obsahujícím 2 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 200 μM každého deoxyribonukleosid trifosfátu (dNTP), 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 5 μM každého primeru a 1,7 jednotek Taq DNA polymerasy (Promega). Reakce byly provedeny při 94 °C po dobu 30 sekund, 58 °C po dobu 30 sekund a 72 °C po dobu 60 sekund celkem 35 cyklů, potom následovala 10 minutová extense při 72 °C. PCR-primery byly vybrány ze sekvence Ad5CMV-p53 se sense primerem umístěným na 3' konci p53 cDNA (5'-GCCTGTCCTGGGAGAGACCG-3', SEQ ID NO: 7), a antisense primer byl vybrán z E1B regionu adenoviru typu 5 (5'-CCCTTAAGCCACGCCCACAC-3', SEQ ID NO: 8). PCR produkt (838 bp fragment) byl separován na 1% agarosovém gelu. Stejný PCR produkt byl subklonován do pCR-Script vektoru (Stratagene), sekvencován,

22.07.98

a na gelu přečištěný insert byl použit jako proba pro detekci PCR produktu. Pro moč byla PCR provedena ve 20 μl objemu obsahujícím 2 mM $MgSO_4$, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 mg/ml hovězího sérového albuminu, 200 μM každého deoxyribonukleosid trifosfátu (dNTP), 5 μM každého primeru a 2,5 jednotek TaqPlus long DNA polymerasy (Stratagene). Reakce byly provedeny při 93 °C po dobu 60 sekund, a potom při 93 °C po dobu 30 sekund, 65 °C po dobu 45 sekund a 72 °C po dobu 45 sekund, celkem 35 cyklů, a potom následovala 10 minutová extense při 72 °C. PCR-primery byly vybrány ze sekvence Ad5CMV-p53 se sense primerem umístěným na 3' konci p53 cDNA (5'-CACTGCCCAACAACACCA-3', SEQ ID NO: 9), a antisense primer byl vybrán z E1B regionu adenoviru typu 5 (5'-GCCACGCCCACACATTT-3', SEQ ID NO: 10). PCR produkt (724 bp fragment) byl separován na 1% agarosovém gelu.

Southern blot analýza. V Southern blotu použitém pro ověření specificity PCR produktu byla DNA v gelu denaturována a neutralizována před blottingem na nylonové membráně (Hybond N+, Amersham) kapilární absorpcí. Membrána byla předem hybridizována po dobu 15 minut při 65 °C v Rapid-hyb pufru (Amersham) a byla hybridizována ve stejném pufru obsahujícím ^{32}P-značenou probu po dobu 1 - 2 hodin. Membrána byla dvakrát promyta v 0,1 x SSC a 0, 1% SDS při pokojové teplotě a znovu dvakrát při 65 °C (15 minut na promytí). Promyté membrány byly exponovány na rentgenový film při -70 °C po dobu 1 - 16 hodin s intenzifikovaným snímáním.

Kontroly a skorování testovaných vzorků. Následující kontroly byly obsažené v každé vsádce vzorků. V kroku izolace DNA byly použity dvě "negativní" sérové kontroly (odebrané a aliquotované sérum od zaměstnaců Introgen) a dvě pozitivní kontroly skládající

22.07.98

se z negativního séra s napíchnutím 10 pfu nebo 100 pfu AdCMV-p53 viru. Toto bylo provedeno pro získání okénka sensitivity, kde byly kontroly 10 (a 100) pfu pozitivní, ale negativní kontroly byly negativní. Když byly negativní kontroly pozitivní, byla PCR reakce opakována s pouze 30 cykly. Když byla 10 pfu kontrola negativní, pak byla DNA dále přečištěna dalším srážením ethanolem a PCR byla opakována. Výše uvedené dva kroky vždy umístily parametry pokusu do příslušného okénka sensitivity.

V stadiu PCR byly použity pozitivní kontrola 1 ng AdCMV-p53 DNA (izolovaná z klinické šarže) a negativní kontrola (H_2O). PCR vsádka byla opakována pouze tehdy, když byla jakákoliv z kontrol falešná. Nebyly neúspěšné negativní PCR kontroly.

Pro potvrzení předpoládané pozitivity byla DNA znovu izolována ze séra (spolu s několika časově sousedními vzorky) a PCR této DNA byla opakována. Vzorky byly počítány jako pozitivní pouze tehdy, pokud byly výsledky reprodukovatelné. Ty vzorky, které byly pozitivní při jedné nebo dvou analýzách vzorků, byly pro účely zprávy považovány za negativní. Předpokládané pozitivní vzorky, které nemohly být opakovány (vzhledem k chybění dalších nezpracovaných vzorků) byly vyloučeny z database.

Měření účinnosti genového přenosu. Chirurgicky odstraněné vzorky tkáně byly umístěny v kryovialkách, okamžitě rychle zmrazeny a potom uskladněny v kapalném dusíku do použití. Zmrazené vzorky byly dekantovány do ústí nerezového Bessman tissue pulverizer (Spectrum, Houston, TX), který byl předem ochlazen ponořením do kapalného dusíku. Tkáň byla rozmělněna na jemný prášek pěti až deseti údery Bessmanovou paličkou s ocelovým kladivem. Na prášek rozmělněná tkáň byla přenesena do

22.07.98

skleněného tkáňového homogenizeru (Fisher Scientifics, Pittsburgh, PA) obsahujícího 1 ml TRI činidla (Molecular Research, Cincinnati, OH) na 50 mg tkáně a byla homogenizována pěti až deseti tahy nahoru a dolů Teflon paličkou.

Po homogenizaci byla RNA izolována podle instrukcí dodaných s TRI činidlem. Stručně, homogenizáty byly přeneseny do polypropylenových centrifugačních tub (Molecular Research) a byly uskladněny po dobu 5 minut při pokojové teplotě před přidáním chloroformu (0,2 ml na 1 ml TRI činidla). Vzorky byly důkladně promíchány, inkubovány dalších 15 minut při pokojové teplotě a centrifugovány při 12000 x g po dobu 15 minut při 4 °C pro separaci RNA obsahující vodné vrstvy z fenol-chloroformové fáze. Do vodné fáze byl přidán izopropanol a RNA byla precipitována inkubací při pokojové teplotě po dobu 15 minut. RNA pelety byly znovu získány centrifugací při 12000 x g po dobu 15 minut při 4 °C, promyty jednou 75% ethanolem, sušeny vzduchem, rozpuštěny v diethylpyrokarbonatem (DEPC)-ošetřené vodě a kvantifikovány měřením absorbance při 260 nm. Kontaminující DNA byla odstraněna inkubací více než 50 μg RNA s 60 U DNAsy I (Pharmacia, Piscataway, NJ) po dobu 25 minut při 37 °C v celkovém reakčním objemu 260 μl. RNA byla potom extrahována fenol:chloroformem, precipitována ethanolem, promyta jednou 75% ethanolem, peletována centrifugací při maximální rychlosti na mikrofuze po dobu 15 minut při 4 °C, sušena vzduchem, resuspendována v DEPC-vodě a uskladněna při -80 °C. Kvalita RNA byla hodnocena během vzorků na normálním nedenaturujícím 0,8% agarosovém gelu a vizualizací 28S a 18S ribosomálních proužků barvením ethidiumbromidem. Pro eliminaci zkřížené kontaminace mezi vzorky a pro minimalizaci RNAsové aktivity byly všechny nástroje pro opakované použití použité pro izolaci RNA namočeny do 2% Liqui-Nox (Fisher

Scientific) detergenčního roztoku na dobu minimálně 5 minut, vyčištěny od drtě, přeneseny do 10% bělícího roztoku na dobu 3 minut, důkladně opláchnuty deionizovanou vodou, postříkány 100% ethanolem, sušeny, ponořeny do chloroformu a znovu sušeny před použitím.

Reversní transkripce byla provedena za použití 1,5 μg celkové buněčné RNA v 23,5 μl reakční směsi obsahující 11 ng náhodných hexamerů (Gibco BRL, Grand Isalnd, NY), 40 jednotek inhibitoru RNAsy (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 0,4 mM každého dNTP (Perkin elmer, Foster City, CA) a 300 jednotek Superscript II RNAsa H^- reversní transkriptasy (Gibco BRL) v 1 x RT pufru (50 mM Tris pH 8,3, 75 mM chloridu draselného, 3 mM chloridu hořečnatého, a 20 mM dithiothreitolu). RNA a náhodné hexamery byly zahřáty na 70 °C na dobu 10 minut a ochlazeny na ledu před tím, než byl přidán zbytek reakční směsi. Reakce byla inkubována při 25 °C po dobu 5 minut s 200 jednotkami reversní transkriptasy a potom dalších 10 minut při 25 °C po přidání dalších 100 jednotek reversní transkriptasy, pro usnadnění tepelného zpracování primerů, před inkubací při 42 °C po dobu 50 minut. RT-reakce byly ukončeny tepelnou inaktivací reversní transkriptasy po dobu 15 minut při 70 °C. RNA komplementární k cDNA byla odstraněna trávením 1 jednotkou RNAsy H (Boehringer Mannheim) po dobu 20 minut při 37 °C. RNA z linie spinocelulárního karcinomu hlavy a krku (HNSCC) Tu167 infikované rekombinantním adenovirem Ad5CMV-p53 (četnost infekce 100:1) byla použita jako pozitivní kontrola pro detekci virem přeneseného p53 a Tu167 buňky infikované variantním adenovirovým vektorem dl312 (1), který neobsahoval p53 transkripční jednotku, byly použity jako negativní kontrola.

Pro detekci Ad5CMV-p53 transkriptu byla provedena PCR v

22.07.98

reakčním objemu 30 µl obsahujícím 0,2 mM od každého dNTP, 1,5 mM chloridu hořečnatého, 1 jednotku Taq polymerasy (Promega, Madison, WI) a 0,5 mM každého primeru CMV2 (5'-GGTGCATTGGAACGCGGATT, SEQ ID NO: 11) a P53EX3 (5'-GGGGACAGAACGTTGTTTTC, SEQ ID NO: 12) v 1 x PCR pufru (50 mM chloridu draselného, 10 mM Tris pH 9,0, 0,1% Triton X-100). Primery CMV2 a P53EX3 amplifikují 295 bazový fragment specifický pro p53 transkript odvozený od adenoviru. PCR podmínky pro detekci Ad5CMV-p53 transkriptů byly následující:

94 ^{0}C po dobu 1 minuty, potom 94 ^{0}C po dobu 30 sekund, 58 ^{0}C po dobu 40 sekund, 70 ^{0}C po dobu 1 minuty po 35 cyklů, a potom prodloužení při 70 ^{0}C po dobu 10 minut.

Aby bylo zajištěno, že produkt amplifikovaný během PCR detekuje mRNA a ne kontaminující DNA v RNA přípravku, byla také provedena PCR za použití RT produktů z paraleních reakcí, ve kterých nebyla přídána žádná reversní transkriptasa.

RT-PCR specifická pro glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasu (GAPDH) byla provedena pro ověření integrity RT reakcí. 3µl objem RT reakce byl ředěn ve 30 µl PCR směsi obsahující 0,2 mM od každého dNTP, 2 mM chloridu hořečnatého, 1 jednotku Taq polymerasy a 0,5 mM každého primeru GAPDH1 (5'-ACGGATTTGGTCGTATTGGG, SEQ ID NO: 13) a GAPDH2 (5'-TGATTTTGGAGGGATCTCGC, SEQ ID NO: 14) v 1 x PCR pufru. GAPDH primery překlenují 3 exony v lidském GAPDH genu a amplifikují 231-bazový produkt specifický pro mRNA. PCR podmínky pro detekci GAPDH byly následující:

94 ^{0}C po dobu 1 minuty, potom 94 ^{0}C po dobu 30 sekund, 60 ^{0}C

po dobu 12 sekund, 72 °C po dobu 1 minuty po 35 cyklů, a potom extense při 72 °C po dobu 7 minut.

PCR byla provedena za použití Perkin Elmer Gene Amp 9600 termocykleru a všechny primery byly komerčně syntetizovány (Genosys, Woodlands, TX).

Imunohistochemické určení intranádorového genu. Imunoperoxidasové studie byly provedeny na formalinem fixovaných, do parafinu ponořených tkáňových řezech za použití metody avin-biotin-peroxidasového komplexu (ABC) (1). Vzorky byly seříznuty na tloušťku 3 - 4 μm, deparafinizovány v xylenu a rehydratovány v klesajících koncentracích (100-70%) ethanolu. Endogenní peroxidasová aktivita byla blokována 3% peroxidem vodíku v methanolu. Po několika promytích v destilované vodě a ve fosfátem pufrovaném salinickém roztoku (PBS) byly řezy inkubovány s ředěním 1:10 normálního koňského séra pro minimalizaci barvení pozadí. Potom následovala inkubace přes noc při 4 °C s monoklonálními protilátkami k p53 (DO-1, Oncogene Science, Inc., Uniodale, NY; ředění 1:80) a p21 (Oncogene Science, Inc., 1:100). Postup barvení peroxidasou byl proveden za použití ABC Elite kitů (Vector Laboratories, Burlinghame, CA). Imunobarvící reakce byla vizualizována použitím 0,05% 3,3'-diaminobenzidinu v Tris-HCl pufru obsahujícím 0,01% peroxid vodíku, pH 7,6. Řezy byly kontrastně barveny 0,01% toluidinovou modří a umístěny v Permount. Odečet byl proveden počítáním pozitivních nukleárních barvení ve 200 buňkách z 10 následujících plnohodnotných polí, které bylo provedeno dvěma nezávislými pozorovateli.

TUNEL test na fragmentaci DNA. TUNEL test byl proveden za použití Apoptag™ PLUS kitu (Oncor, Gaithersburg, M.D.) podle

instrukcí dodaných výrobcem. Sklíčka byla barvena 4% methylenovou zelení. Odpovídající sklíčka barvená haematoxylinem a eosinem byla hodnocena na přítomnost zánětlivých buněčných infiltrátů a byla známkována stupnicí 1 - 4.

Postup testu na cytopatický účinek. Vzorky moči od pacienta byly také monitorovány na přítomnost Ad5p53 v testu, ve kterém je jakémukoliv viru ve vzorku umožněno infikovat buněčnou monovrstvu. U těchto buněk byl sledován výskyt cytopatického efektu (CPE): buňky se zaoblovaly a oddělovaly se od povrchu. Vzorky moči pacientů testované na CPE byly z první ranní moči odebrané během druhého týdne po prvním cyklu léčby a v den 0 nebo 1 (před léčbou). Vzorky o asi 15 ml byly uskladněny ve sterilních 15 ml konických tubách při -80 °C do použití. IT293 buňky, které tvoří buněčnou monovrstvu pro infikování, jsou kultivovány v DMEM plus 10% FBS, v inkubatoru při 37 °C ve zvlhčeném 10% CO_2. Dva dny před testováním vzorku pacienta byly buňky umístěny v množství 2 x 10^5 na jamku ve 12 jamkových plotnách.

V době testu byly vzorky moči rozmraženy v ledové lázni a aliquoty byly smíseny 1:1 s DMEM a sterilně filtrovány za použití 0,22 μl injekčního filtru. 350 μl aliquota této směsi 1:1 byla pomalu přidána do každé jamky po odstranění kultivačního media. Plotna byla jemně kolíbána o 15 minut později. Po 30 minutách bylo do každé jamky přidáno 2,0 ml DMEM plus 10% FBS pro naředění vzorku. V den 3 (za 72 hodin) a v den 6 testu byly 0,5 ml aliquoty čerstvého media přidány do každé jamky, pro uchování buněčné monovrstvy po dobu maximálně 6 - 7 dní.

Vzorky od pacientů byly testovány trojitě. Ředěné vzorky před ošetřením byly testovány tak jak byly, a také byly napíchnuty

10^5 pfu Ad5p53 na jamku pro detekci jakékoliv složky moči, která by mohla interferovat s detekcí viru tímto postupem. Kontrolní jamky byly inokulovány DMEM samotným napíchnutým 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 nebo 10^1 pfu na jamku, vše dvakrát. Napíchnutí 10^5 pfu způsobovalo CPE za těchto podmínek v den 2 testu; každý následující den vykazovala další napíchnutá kontrola CPE. Proto, doba, kdy je CPE detekován v každém vzorku od pacienta naznačuje hladinu Ad5p53 v tomto vzorku.

Rekombinantní kompetentní adenovirus. Adenovirový p53 použitý v klinickém pokusu byl testován na přítomnost RCA za použití A549 buněk Biotechnology Services Division of Microbiological Associates, Inc., (Rockville, Maryland).

Statistická analýza. Byl použit návrh jednoramenné studie. Pro zabránění zapojení více pacientů, než je nezbytně nutné, do pokusu excesivní toxicity, bylo použito Bayesian pravidlo. WILCOXON test se značením řady a seřazovací test byly použity pro srovnání mezi procentem buněk vykazujících TUNEL a imunohistochemické barvení před léčbou a po léčbě, v příslušném pořadí. Statistická analýza byla provedena za použití Survpac SPSS-statistického balíčku.

Odpověď a toxicita. Přežívání a odpověď byly hodnoceny v této prozatímní analýze, ale nebyly považovány za cíl této analýzy. Účelem této prozatímní analýzy bylo určit potenciál přenosu strategie genového přenosu. U pacientů bylo možné hodnotit odpověď a toxicitu po 30-denním pozorování po jednom cyklu genového přenosu. Toxické účinky terapie byly hodnoceny podle běžných kriterií toxicity National Cancer Institute (Xref.). Odpověď na terapii byla hodnocena CT snímkem a ultrazvukem krku před každou serií léčby. U pacientů bylo možné hodnocení

odpovědi, pokud dostali alespoň jednu serii terapie následovanou vhodnou dokumentací odpovědi. Ti pacienti, u kterých byla provedena chirurgická resekce jejich recidivujících nádorů, nemohli být hodnoceni na odpověď, protože chirurgický výkon byl proveden před 30denním pozorovacím obdobím. Všechny CT snímky byly hodnoceny jedním radiologem, a ultrazvuková vyšetření jiným. Částečná odpověď byla definována jako 50% nebo vyšší redukce součtu součinů průměrů měřitelného nádoru; slabá odpověď byla definována jako 25% až méně než 50% redukce součtu součinů průměrů měřitelné léze. Progrese onemocnění byla definována jako 25% nebo vyšší zvýšení součtu součinů průměrů.

Přežití bylo měřeno od doby vstupu do vypršení protokolu. Odpověď každého pacienta byla posouzena komisí pro posouzení dat skládající se z ORL chirurgického onkologa, radiologa a klinického onkologa.

Výsledky

Detekce vektoru. DNA adenovirového vektoru byla detekována PCR v séru stejně jako ve vzorcích moči od pacientů až do 48 hodin po genovém přenosu. Limit detekce pro vektor je 1 - 5 virových částic. Virová DNA byla izolována z moči od pacientů, u kterých proběhl genový přenos při každé dávce viru, ale nebyla detekována po 48 hodinách po genovém přenosu. Detekce virové DNA v séru se zvyšovala se zvyšující se dávkou viru nad 10^7 pfu, ale také nebyla detekovatelná 48 hodin po genovém přenosu.

Vzorky moči byly nejprve analyzovány na infekční virus, byl měřen CPE na buněčné monovrstvy před PCR analýzou nukleotidů. Virus přítomný v mooči byl aplikován na 293 buňky jak bylo popsáno výše, pro sledování CPE, který se projevuje při

zaokrouhlování buněk a odchlipování z Petriho misky. CPE byl ve vzorcích identifikován vzácně. CPE byl nalezen později v překryvných kulturách (více než šest dní) a tyto výsledky byly považovány za rovnocenné. V žádném případě nebyl CPE potvrzen PCR a Southern blot přenosem stejného vzorku moči pro detekované adenovirové nukleotidy.

Analýza na virovou DNA v jiných orgánových systemech. PCR analýza demonstrovala virovou DNA více než dva měsíce po přenosu 10^9 Ad5CMV-p53 genu v kůži, srdečním svalu, plících a testikulární tkáni v rychle zmrazených autoptických vzorcích pečlivě odebraných pro zabránění zkřížené kontaminace mezi tkáněmi. V parenchymu ledvin, nadledvin a ve tkáni slinivky břišní nebyly prokázány virové DNA sekvence specifické pro tento vektor. Imunohistochemická analýza těchto autoptických vzorků neukázala důkazy nadměrné exprese proteinového produktu přirozeného p53.

Hodnocení genového přenosu. Všechny analýzy byly provedeny alespoň 1 hodinu po expozici tkáně vektoru. mRNA produkt byl detekován ve 4 hodině a v 48 hodině pomocí RT-PCR. Oproti tomu, bioptické vzorky zmrazené 1 hodinu po expozici nebo méně nevykazovaly žádnou p53 mRNA. Kromě toho, negativní kontrolní vzorky získané z operačního místa, které nebyly podrobeny genovému přenosu, byly také negativní na PCR produkt. Bioptické vzroky s přenosem a bez přenosu od čtyřech pacientů byly analyzovány RT-PCR na přítomnost Ad5CMV-p53 transkribované mRNA. Vzorky s přenosem od dvou pacientů byly pozitivní na EtBr barvených gelech, zatímco žádný Ad5CMV-p53 produkt nebyl detekován v jakémkoliv vzorku bez přenosu i přes skutečnost, že GAPDH mohl být amplifikován ze všech vzorků. Specificita 295 bp

PCR produktu od dvou pozitivních pacientů byla potvrzena Southern blottingem. Protože PCR produkt nebyl pozorován, pokud byla reversní transkriptasa vynechána z RT reakcí, musel být 295 bp produkt detekovaný ve vzorku generován z mRNA, spíše než z kontaminující DNA.

Imunohistochemická analýza. Všechny vzorky od pacientů před a po genovém přenosu byly simultánně analyzovány s pozitivními a negativními kontrolami v každém pokusu. Více řezů každého vzorku bylo analyzováno a srovnáváno při barvení haematoxylinem a eosinem, stejně jako při TDT koncovém značení. Bioptické vzorky po injekci vektoru potvrdily přenos genu u tří pacientů, v jejichž bioptických vzorcích před přenosem nebyla prokázána endogenní nadměrná exprese p53 proteinu. U 5 z 21 pacientů (27%) nebyl p21 (CIP/WAF1) signifikantně endogenně exprimován; toto je ověřeno jako informativní pro genový přenos ve vzorcích od pacientů po genovém přenosu. Nadměrná exprese p53 jaderného proteinu byla také pozorována v lymfocytech asociovaných s nádorem, stejně jako v buňkách nádorového stromatu, což ukazuje, že také proběhl přenos do nenádorových buněk.

Serologická protilátková odpověď. Protilátky proti adenoviru serotyp 5 byly indukovány u všech pacientů po opakovaných injekcích vektoru. Nicméně, nebylo zjištěno, že by byla účinnost přenosu signifikantně změněna při srovnání počátečního cyklu genového přenosu a následujících cyklů. Mírný erytem v místě injekce do nádoru byl pozorován od 3 x 10^9 PFU, nicméně, tyto lokální reakce neomezovaly toleranci vektoru. Žádné důkazy systemové sensitivity nebyly nalezeny u žádného pacienta, i přes opakované podávání viru po dobu šesti následujících měsíců u pacienta léčeného 10^9 PFU.

22.07.98

Patologická pozorování. Dráhy jehel byly identifikovány ve většině bioptických vzorků a exprese genového produktu byla demonstrována v hlubších tkáních pod místy injekce. Podobně, nález koncově značených buněk v oblastech s přenosem naznačuje indukci apoptosy v nádorových buňkách, ale absenci apoptosy ve stromálních nebo v zánětlivých buňkách. Zánětlivé buňky byly zaznamenány u pacientů a staly se nejvýraznějším histologickým nálezem u pacientů, kteří dostali dávky 10^9 nebo vyšší. Zajímavé je, že pacient číslo 7, jehož vzorek exprimoval endogenní přirozený p53, vykazoval hemorrhagickou nekrosu bez důkazu životaschopného nádoru v seriových řezech chirurgických vzorků jeho recidivujícího 2 cm nádoru krku po jednom cyklu genového přenosu. Patologický nález nekrosy, stejně jako indukce apoptosy, byly častým pozorováním ve vzorcích.

Klinická pozorování. Pacienti tolerovali přímé injekce vektoru do nádorů a nejčastějším vedlejším účinkem byl diskomfort v místě vpichu. Příznaky lokálního erytemu v místě injekce byly zaznamenány při 10^9 PFU vektoru a vyšších, ačkoliv systemové důkazy hypersensitivity nebyly pozorovány, i přes důkazy zvýšení systemového titru protilátek. Pacienti číslo 5, 10 a 16 zůstávali bez příznaků onemocnění s medianem sledování sedm měsíců. Pacienti 7 a 13 vykazovali stabilizované onemocnění po dobu 3, resp. 5 měsíců v indikatorové oblasti léze. Pacient číslo 20 vykazoval částečnou odpověď, jak bylo ověřeno CT snímkem a ultrazvukovým vyšetřením, ale došlo u něj ke vzniku páteřních a pleurálních metastas, které vyžadovaly jeho vyřazení ze studie vzhledem k progresi onemocnění.

Závěrem lze shrnout, že u pacientů s recidivujícím

22.07.98

spinocelulární karcinomem hlavy a krku je adenovirem zprostředkovaný genový přenos přirozeného p53 bezpečný a může být účinně proveden u nádorových buněk a normálních buněk pomocí přímé nitronádorové injekce nebo intraoperativní instilace vektoru. U žádného z pacientů se neprojevila toxicita, která by mohla limitovat podání vektoru nebo zvyšování dávky. Exprese transgenového produktu byla nezměněna i přes vývoj systemové protilátkové odpovědi. Lokální zánětlivá odpověď zjištěná patologickým vyšetřením ve vzorcích resekovaného nádoru může být ve skutečnosti prospěšná.

22.07.98

Odkazy

Následující odkazy, v rozsahu, ve kterém podávají příklady procedurálních nebo jiných detailů, které jsou doplňující k tomu, co je zde uvedeno, jsou zde specificky uvedeny jako odkazy:

"Cancer facts and figures," American Cancer Society, Washington, DC: ACS. (Publication no. 90-425 M. no. 5008-LE).1990.

Cancer Facts and Figures, Publication No 93-400. M No. 5008-93. Washington. DC: American Cancer Society, 1993.

Anderson *et al.* US 5,399,346, 1995.

Baichwal and Sugden, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," *In:* Kucherlapati R. ed. Gene transfer. New York: Plenum Press, pp. 117-148. 1986.

Baker *et al.*, "Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type *p53*," *Science*, 249:912-915, 1990.

Barbacid, M. "*ras* genes," *Ann. Rev. Biochem.*, 56:779-827, 1985.

Bartek *et al.*, "Genetic and immunochemical analysis of mutant *p53* in human breast cancer cell lines," *Oncogene*, 5:893-899, 1990.

Benvenisty and Neshif. "Direction introduction of genes into rats and expression of the genes," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 83:9551-9555. 1986.

22.07.98

Berenson *et al.*, "Frequent amplification of the bcl-1 locus in head and neck squamous cell carcinomas," *Oncogene*, 4:1111-1116, 1989.

Berges *et al.*, "Cell proliferation, DNA repair, and *p53* function are not required for programmed cell death of prostatic glandular cells induced by androgen ablation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8910-8914, 1993.

Berkner, "Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes," *BioTechniques*, 6:616-629, 1988.

Bos, J., "*ras* oncogenes in human cancer: A review," *Cancer Res.*, 49:2682, 1989.

Boshart *et al.*, "A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus," *Cell*, 41:521-530, 1985.

Boussif *et al.*, "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7297-7301, 1993.

Boyle *et al.*, "The Incidence of *p53* Mutation Increases with Progression of Head and Neck Cancer," *Can Res.*, 53:4477-4480, 1993.

Brennan *et al.*, "Molecular Assessment of Histopathological Staging in Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck," *NEJM*, 332(7):429-425, 1995.

Brown *et al.*, "Modulation of *ras* Expression by Anti-sense, Nonionic Deoxyoligonucleotide Analogs," *Oncogene Res.*, 4:243-252, 1989.

22.07.98

Cai *et al.*, "Stable expression of the wide-type *p53* gene in human lung cancer cells after retrovirus-mediated gene transfer," *Human Gene Therapy*, 4:617-624, 1993.

Calhoun *et al.*, "Distant Metastases from Head and Neck Squamous Cell Carcinomas," *Laryngoscope*, 104:1199-1205, 1994.

Campbell, in Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, Eds. pp. 75-83, Amsterdam, Elseview, 1984

Chen *et al.*, "Genetic mechanisms of tumor suppression by the human *p53* gene," *Science*, 250:1576-1580, 1990.

Chen and Okayama, "High-efficiency transfection of mammalian cells by plasmid DNA," *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987.

Chomczynski and Sacchi, "Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction," *Anal. Biochem.*, 162:156-159, 1987.

Chung *et al.*, "Discordant *p53* gene mutations in primary head and neck cancers and corresponding second primary cancers of the upper aerodigestive tract," 53:1676-1683, 1993.

Clarke *et al.*, "Thymocyte apoptosis induced by *p53*-dependent and independent pathways," *Nature*, 362:849-852, 1993.

22.07.98

Clayman *et al.*, "Regulation of Urokinase-Type Plasminogen Activator Expression in Squamous-Cell Carcinoma of the Oral Cavity," *Int J Cancer*, 54:73-80, 1993.

Couch *et al.*, "Immunization with types 4 and 7 adenovirus by selective infection of the intestinal tract," *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88:394-403, 1963.

Culver *et al.*, "*in vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors," *Science*, 256:1550-1552, 1992.

Debus *et al.*, "Effects of Antisense Oligodeoxyribonucleotides Complementary mRNA of the Human *c*-Harvey-*ras* Oncogene on Cell Proliferation," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 116 (Suppl. Part 1):S-162, 1990.

Der and Cooper, *Cell*, 32:201-8, 1983.

Diller *et al.*, "*p53* function as a cell cycle control protein in osteosarcomas," *Mol. Cell. Biol.*, 10:5772-5781, 1990.

Donehower *et al.*, "Mice deficient for *p53* are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors," *Nature*, 356:215-221, 1992.

Dubensky *et al.*, "Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:7529-7533, 1984.

El-Deiry *et al.*, "WAF1/CIP1 is induced in *p53*-mediated G_1 arrest and apoptosis," *Cancer Res.*, 54:1169-1174, 1994.

Fearon *et al.*, *Science*, 247:49, 1990.

22.07.98

Fechheimer *et al.*, "Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.

Ferkol *et al.*, *FASEB J.*, 7:1081-1091, 1993.

Field *et al.*, "Elevated expression of the c-myc oncoprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma." *Oncogene*, 4:1463-1468, 1989.

Field *et al.*, "The Role of the *p53* Tumor Suppressor Gene in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck," *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 119:1118-1122, 1993.

Fraley *et al.*, "Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: Potential for gene transfer," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.

Fridman *et al.*, "The minimal fragments of c-Raf-1 and NF1 that can suppress a v-Ha*ras*-induced phenotype," *J. Biol. Chem.*, 269:30105-30108, 1994.

Friedmann, "Progress toward human gene therapy," *Science*, 244:1275-1281, 1989.

Fujiwara *et al.*, "Therapeutic effect of a retroviral wild-type *p53* expression vector in an orthotopic lung cancer model," *JNCI*, 86:1458-1462, 1994.

Fujiwara *et al.*, "A retroviral wild-type *p53* expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis." *Cancer Res.*, 53:4129-4133, 1993.

22.07.96

Gefter *et al.*, Somatic Cell Genet. 3:231-236 (1977)

Georges *et al.*, "Prevention of Orthotopic Human Lung Cancer Growth by Intratracheal Instillation of a Retroviral Antisense K-*ras* Construct." *Cancer Res.*, 53:1743-1746, 1993.

Ghosh-Choudhury *et al.*, "Protein IX, a minor component of the human adenovirus capsid, is essential for the packaging of full-length genomes," *EMBO J.*, 6:1733-1739, 1987.

Ghosh and Bachhawat, "Targeting of liposomes to hepatocytes," *In:* Wu G. and C. Wu ed. Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands. New York: Marcel Dekker, pp. 87-104, 1991.

Goding, 1986, in Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., Orlando, Fla., Academic Press, 1986, pp. 60-61, 65-66, 71-74.

Gomez-Foix *et al.*, "Adenovirus-mediated transfer of the muscle glycogen phosphorylase gene into hepatocytes confers altered regulation of glycogen." *J. Biol. Chem.*, 267:25129-25134, 1992.

Gopal, "Gene transfer method for transient gene expression, stable transfection, and cotransfection of suspension cell cultures," *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.

Gorczyca *et al.*, "Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays." *Cancer Res.*, 53:1945-1951, 1993.

22.07.98

Graham and Prevec, "Adenovirus-based expression vectors and recombinant vaccines," *Biotechnology*, 20:363-390, 1992.

Graham and Prevec, "Manipulation of adenovirus vector," *In:* E.J. Murray (ed.), Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocol, Clifton, NJ: Humana Press, 7:109-128, 1991.

Graham *et al.*, "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5", *J. Gen. Virol.*, 36:59-72, 1977.

Graham and van der Eb, "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA", *Virology*, 52:456-467, 1973.

Grunhaus and Horwitz, "Adenovirus as cloning vector," *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.

Harland and Weintraub, "Translation of mammalian mRNA injected into Xenopus oocytes is specifically inhibited by antisense RNA," *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.

Hartwell and Kastan, "Cell cycle Control and Cancer," *Science*, 266:1821-1828, 1994.

Hermonat and Muzycska, "Use of adenoassociated virus as a mammalian DNA cloning vector: Transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:6466-6470, 1984.

22.07.98

Herz and Gerard. "Adenovirus-mediated transfer of low density lipoprotein receptor gene acutely accelerates cholesterol clearance in normal mice." *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:2812-2816, 1993.

Hoollstein *et al.*, "*p53* mutations in human cancers," *Science*, 253:49-53, 1991.

Hopp *et al.*, "A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Identification and Purification of Recombinant Proteins," *BioTechnology*, 7:1205-1210, 1988.

Hsu *et al.*, "Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: a Comparison Between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures," *J. Histochem. Cytochem.*, 29:577-580, 1981.

Jones and Shenk, "Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 5," *Cell*, 13:181-188, 1978.

Kaneda *et al.*, "Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver," *Science*, 243:375-378, 1989.

Karlsson *et al.*, *EMBO J.*, 5:2377-2385, 1986.

Kashani-Sàbet *et al.*, "Reversal of the malignant phenotype by an anti-*ras* ribozyme," *Antisense Res. Dev.*, 2:3-15, 1992.

Kastan *et al.*, "A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing *p53* and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia," *Cell*, 71:587-597, 1992.

Kato *et al.*, "Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver," *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.

22.07.98

Klein *et al.*, "High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells," *Nature*, 327:70-73, 1987.

Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976.

Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975.

Kozarsky and Wilson, "Gene Therapy: Adenovirus Vectors," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 3:499-503, 1993.

Kyte and Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein," *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.

Lane and Crawford, "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." *Nature*, 278:261-3, 1979.

Le Gal La Salle *et al.*, "An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain," *Science*, 259:988-990, 1993.

Levrero *et al.*, "Defective and nondefective adenovirus vectors for expressing foreign genes *in vitro* and *in vivo*," *Gene*, 101: 195-202, 1991.

Li *et al.*, "Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy," *Hum. Gene Ther.*, 4:403-409, 1993.

Linzer and Levine, "Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells." *Cell*, 17:43-52, 1979.

22.07.98

Lowe *et al.*, "*p53* is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes," *Nature*, 362:847-849, 1993.

Maestro *et al.*, "High frequency of *p53* gene alterations associated with protein overexpression in human squamous cell carcinoma of the larynx," *Oncogene*, 7:1159-1166, 1992.

Mann *et al.*, "Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus," *Cell*, 33:153-159, 1983.

Markowitz *et al.*, "A safe packaging line for gene transfer: Separating viral genes on two different plasmids," *J. Virol.*, 62:1120-1124, 1988.

Martinez *et al.*, "Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive *p53* protein," *Genes Dev.*, 5:151-159, 1991.

Marx, "Learning how to suppress cancer," *Science*, 261:1385-1387, 1993.

Mashal *et al.*, "Rearrangement and expression of *p53* in the chronic phase and blast crisis of chronic myelogenous leukemia," *Blood*, 75:180-189, 1990.

Matlashewski *et al.*, "Isolation and characterization of a human *p53* cDNA clone: expression of the human *p53* gene," *The EMBO Journal*, 3(13):3257-3262, 1984.

Mercer *et al.*, "Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type *p53*," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6166-6170, 1990.

Merino *et al.*, "An Analysis of Distant Metastasis From Squamous Cell Carcinoma of the Upper Respiratory and Digestive Tracts," *Cancer*, 40:147-156, 1977.

Mietz *et al.*, "The transcriptional transactivation function of wild-type *p53* is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein," *EMBO J.*, 11:5013-5020, 1992.

Mitsudomi *et al.*, "*p53* gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of *ras* mutations and clinical features." *Oncogene*, 7:171-180, 1992.

Mukhopadhyay *et al.*, "Specific Inhibition of K-*ras* Expression and Tumorigenicity of Lung Cancer Cells by Antisense RNA," *Cancer Res.*, 51:1744-1748, 1991.

Mulcahy *et al.*, "Requirements for *ras* protoonogene function during serum-stimulated growth of NIH/3T3 cells," *Nature*, 313:241-243, 1985.

Mulligan, "The Basic Science of Gene Therapy," *Science*, 260:926-932, 1993.

Myers, EPO 0273085

Nicolau *et al.*, "Liposomes as carriers for *in vivo* gene transfer and expression," *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.

Nicolau and Sene. "Liposome-mediated DNA transfer in eukaryotic cells." *Biochem. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.

Nylander *et al.*, "*p53* Expression and Cell Proliferation in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck," *Cancer*, 75:87-93, 1995.

O'Malley, Jr. *et al.*, "Adenovirus-mediated Gene Therapy for Human Head and Neck Squamous Cell Cancer in a Nude Mouse Model," *Cancer Res*, 55:1080-1085, 1995.

Ogiso *et al.*, "Suppression of various human tumor cell lines by a dominant negative H-*ras* mutant," *Gene Ther.*, 1:403-407, 1994.

Oren and Levine, "Molecular cloning of a cDNA specific for the murine *p53* cellular tumor antigen," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:56-59, January 1983.

Pavelic *et al.*, "Overexpression of *p53* Protein is Common in Premalignant Head and Neck Lesions," *Anticancer Research*, 14:2259-2266, 1994.

Perales *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4086-4090, 1994.

Potter *et al.*, "Enhancer-dependent expression of human k immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.

Racher *et al.*, *Biotechnology Techniques*, 9:169-174, 1995.

Ragot *et al.*, "Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice," *Nature*, 361:647-650, 1993.

Ramqvist *et al.*, "Wild-type *p53* induces apoptosis in a Burkitt lymphoma (BL) line that carries mutant *p53*," *Oncogene*, 8:1495-1500, 1993.

Rao *et al.*, "The adenovirus E1A proteins induce apoptosis which is inhibited by the E1B 19K and Bcl-2 proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:7742-7746, 1992.

Renan, "Cancer genes: current status, future prospects, and applicants in radiotherapy/oncology," *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990.

Rich *et al.*, "Development and analysis of recombinant adenoviruses for gene therapy of cystic fibrosis," *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993.

Ridgeway, "Mammalian expression vectors," *In:* Rodriguez RL, Denhardt DT, ed. Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Stoneham: Butterworth, pp. 467-492, 1988.

Rippe *et al.*, "DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture," *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.

Rodrigues *et al.*, "*p53* mutations in colorectal cancer," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:7555-7559, 1990.

Rosenfeld *et al.*, "*in vivo* transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium," *Cell*, 68:143-155, 1992.

Rosenfeld *et al.*, "Adenovirus-mediated transfer of a recombinant a1-antitrypsin gene to the lung epithelium *in vivo*," *Science*, 252:431-434, 1991.

Roth *et al.*, U.S. Serial No. 07/987.235

Sacks *et al.*, "Establishment and Characterization of Two New Squamous Cell Carcinoma Cell Lines Derived from Tumors of the Head and Neck," *Cancer Res.*, 48:2858-2866, 1988.

Shaulsky *et al.*, "Nuclear accumulation of *p53* protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis," *Mol Cell Biol.* 10(12):6565-6567, 1990.

Shaw *et al.*, "Induction of apoptosis by wild-type *p53* in a human colon tumor-derived cell line," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4495-4499, 1992.

Shirasawa *et al.*, "Altered Growth of Human Colon Cancer Cell Lines Disrupted at Activated Ki-*ras*," *Science*, 260:85-88, 1993.

Somers *et al.*, "Amplification of the int-2 gene in human head and neck squamous cell carcinomas," *Oncogene*, 5:915-920, 1990.

Southern and Berg, "Transformation of Mammalian Cells to Antibiotic Resistance with a Bacterial Gene Under Control of the SV40 Early Region Promoter," *J. Mol. App. Gen.*, 1:327-341, 1982.

Stratford-Perricaudet and Perricaudet," Gene transfer into animals: the promise of adenovirus," p. 51-61, *In: Human Gene Transfer*, Eds, O. Cohen-Haguenauer and M. Boiron, Editions John Libbey Eurotext, France, 1991.

22.07.98

Stratford-Perricaudet *et al.*, "Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector," *Hum. Gene Ther.*, 1:241-256, 1990.

Su *et al.*, "Production of Recombinant Porcine Tumor Necrosis Factor Alpha in a Novel E.coli Expression System," *Biotechniques*, 13(5):756-761, 1992.

Tabin *et al.*, *Nature*, 300:143-149, 1982.

Takahashi *et al.*, "The *p53* gene is very frequently mutated in small-cell lung cancer with a distinct nucleotide substitution pattern," *Cancer Res.*, 52:734-736, 1992.

Thawley and Panje, eds, "Comprehensive Management of Head and Neck Tumors," Philadelphia: WB Saunders, 2:1158-1172, 1987.

Top *et al.*, "Immunization with live types 7 and 4 adenovirus vaccines. II. Antibody response and protective effect against acute respiratory disease due to adenovirus type 7," *J. Infect. Dis.*, 124:155-160, 1971.

Tur-Kaspa *et al.*, "Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes," *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.

van der Riet *et al.*, "Frequent loss of chromosome 9 p21-22 early in head and neck cancer progression," *Cancer Res.*, 54:1156-1158, 1994.

Wagner *et al.*, *Science*, 260:1510-1513, 1993.

22.07.98

Wang *et al.*, "Apoptosis induced in human osteosarcoma cells is one of the mechanisms for the cytocidal effect of AdCMV-*p53*," *Cancer Gene Therapy*, 2(1):1-9, 1995.

Watling *et al.*, "Overexpression of *p53* in Head and Neck Cancer," *Head and Neck*, 14:437-444, 1992.

Wijsman *et al.*, "A new method to detect apoptosis in parriffin section: *in situ* end-labeling of fragmented DNA," *J. Histochem. Cytochem.*, 41:7-12, 1993.

Wilcock and Lane, "Localization of *p53*, retinoblastoma, and host replication proteins at sites of viral replication in herpes-infected cells," *Nature*, 349:429-431, 1991.

Wong *et al.*, "Appearance of β-lactamase activity in animal cells upon liposome mediated gene transfer," *Gene*, 10:87-94, 1980.

Wu and Wu, "Receptor-mediated *in vitro* gene transfections by a soluble DNA carrier system," *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.

Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.

Wu and Wu, "Evidence for targeted gene delivery to HepG2 hepatoma cells *in vitro*," *Biochemistry*, 27:887-892, 1988.

Wu and Levine, "*p53* and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3602-3606, 1994.

22.07.96

Yamamoto *et al.*, "High incidence of amplification of the epidermal growth factor receptor gene in human squamous carcinoma cell lines," *Cancer Res.*, 46:414-416, 1986.

Yang *et al.*, "*in vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 87:9568-9572, 1990.

Yonish-Rouach *et al.*, "Wild-type *p53* induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6," *Nature*, 352:345-347, 1991.

Yuasa *et al.*, *Nature*, 303:775-559, 1983.

Zelenin *et al.*, "High-velocity mechanical DNA transfer of the chloramphenicol acetyltransferase gene into rodent liver, kidney and mammary gland cells in organ explants and *in vivo*," *FEBS Lett.*, 280:94-96, 1991.

Zhang *et al.*, U.S. Serial No. 08/423,573

Zhang and Roth, U.S. Serial No. 08/222,285

Zhang *et al.*, "Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated transfection and PCR analysis," *Biotechniques*, 15:868-872, 1993.

Zhang *et al.*, "High-efficiency gene transfer and high-level expression of wild-type *p53* in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus," *Cancer Gene Therapy*, 1:1-10, 1994.

22.07.98

Seznam sekvencí

(1) Obecné informace

(i) Přihlašovatel:

(A) Jméno: Board of Regents, The University of Texas system

(B) Ulice: 201 West 7th Street

(C) Město: Austin

(D) Země: Texas

(E) Stát: USA

(F) Poštovní kod (ZIP): 78701

(ii) Způsoby a kompozice pro diagnosu nádorů

(iii) Počet sekvencí: 14

(iv) Počítačová čtecí forma:

(A) Typ media: Floppy disk

(B) Počítač: IBM PC kompatibilní

(C) Operační system: PC-DOS/MS-DOS

(D) Software: PatentIn Release #1.0, verse #1.30 (EPO)

(v) Data současné přihlášky:

(A) Číslo přihlášky: neznámé

(B) Datum podání: souběžně

(C) Klasifikace: neznámá

(vi) Data předešlé přihlášky:

(A) Číslo přihlášky: US 60/007810

(B) Datum podání: 30.11.1995

22.07.98

(B) Datum podání: 30.11.1995

(2) Informace pro SEQ ID NO: 1.

(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 2066 párů basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

CAAAACCTAC CAGGGCAGCT ACGGTTTCCG TCTGGGCTTC TTGCATTCTG GGACAGCCAA 60

GTCTGTGACT TGCACGTACT CCCCTGCCCT CAACAAGATG TTTTGCCAAC TGGCCAAGAC 120

CTGCCCTGTG CAGCTGTGGG TTGATTCCAC ACCCCCGCCC GGCACCCGCG TCCGCGCCAT 180

GGCCATCTAC AAGCAGTCAC AGCACATGAC GGAGGTTGTG AGGCGCTGCC CCCACCATGA 240

GCGCTGCTCA GATAGCGATG GTCTGGCCCC TCCTCAGCAT CTTATCCGAG TGGAAGGAAA 300

TTTGCGTGTG GAGTATTTGG ATGACAGAAA CACTTTTCGA CATAGTGTGG TGGTGCCCTA 360

TGAGCCGCCT GAGGTTGGCT CTGACTGTAC CACCATCCAC TACAACTACA TGTGTAACAG 420

TTCCTGCATG GGCGGCATGA ACCGGAGGCC CATCCTCACC ATCATCACAC TGGAAGACTC 480

CAGTGGTAAT CTACTGGGAC GGAACAGCTT TGAGGTGCGT GTTTGTGCCT GTCCTGGGAG 540

AGACCGGCGC ACAGAGGAAG AGAATCTCCG CAAGAAAGGG GAGCCTCACC ACGAGCTGCC 600

CCCAGGGAGC ACTAAGCGAG CACTGCCCAA CAACACCAGC TCCTCTCCCC AGCCAAAGAA 660

GAAACCACTG GATGGAGAAT ATTTCACCCT TCAGATCCGT GGGCGTGAGC GCTTCGAGAT 720

GTTCCGAGAG CTGAATGAGG CCTTGGAACT CAAGGATGCC CAGGCTGGGA AGGAGCCAGG 780

22.07.98

GGGGAGCAGG GCTCACTCCA GCCACCTGAA GTCCAAAAAG GGTCAGTCTA CCTCCCGCCA 840

TAAAAAACTC ATGTTCAAGA CAGAAGGGCC TGACTCAGAC TGACATTCTC CACTTCTTGT 900

TCCCCACTGA CAGCCTCCCA CCCCCATCTC TCCCTCCCCT GCGATTTTGG GTTTTGGGTC 960

TTTGAACCCT TGCTTGCAAT AGGTGTGCGT CAGAAGCACC CAGGACTTCC ATTTGCTTTG 1020

TCCCGGGGCT CCACTGAACA AGTTGGCCTG CACTGGTGTT TTGTTGTGGG GAGGAGGATG 1080

GGGAGTAGGA CATACCAGCT TAGATTTTAA GGTTTTTACT GTGAGGGATG TTTGGGAGAT 1140

GTAAGAAATG TTCTTGCAGT TAAGGGTTAG TTTACAATCA GCCACATTCT AGGTAGGGGC 1200

CCACTTCACC GTACTAACCA GGGAAGCTGT CCCTCACTGT TGAATTTTCT CTAACTTCAA 1260

GGCCCATATC TGTGAAATGC TGGCATTTGC ACCTACCTCA CAGAGTGCAT TGTGAGGGTT 1320

AATGAAATAA TGTACATCTG GCCTTGAAAC CACCTTTTAT TACATGGGGT CTAGAACTTG 1380

ACCCCCTTGA GGGTGCTTGT TCCCTCTCCC TGTTGGTCGG TGGGTTGGTA GTTTCTACAG 1440

TTGGGCAGCT GGTTAGGTAG AGGGAGTTGT CAAGTCTCTG CTGGCCCAGC CAAACCCTGT 1500

CTGACAACCT CTTGGTGAAC CTTAGATCCT AAAAGGAAAT GTCACCCCAT CCCACACCCT 1560

GGAGGATTTC ATCTCTTGTA TAGATGATCT GGATCCACCA AGACTTGTTT TAGCTCAGGG 1620

TCCAATTTCT TTTTTCTTTT TTTTTTTTTT TTTCTTTTTC TTTGAGACTG GGTCTCTTTG 1680

TTGCCCCAGG CTGGAGTGGA GTGGCGTGAT CTGGCTTACT GCAGCCTTTG CCTCCCCGGC 1740

TCGAGCAGTC CTGCCTCAGC CTCCGGAGTA GCTGGGACCA CAGGTTCATG CCACCATGGC 1800

CAGCCAACTT TTGCATGTTT TGTAGAGATG GGGTCTCACA GTGTTGCCCA GGCTGGTCTC 1860

AAACTCCTGG GCTCAGGCGA TCCACCTGTC TCAGCCTCCC AGAGTGCTGG GATTACAATT 1920

GTGAGCCACC ACGTCCAGCT GGAAGGGTCA ACATCTTTTA CATTCTGCAA GCACATCTGC 1980

ATTTTCACCC CACCCTTCCC CTCTTCTCCC TTTTTATATC CCATTTTTAT ATCGATCTCT 2040

TATTTTACAA TAAAACTTTG CTGCCA 2066

22.07.98

(2) Informace pro SEQ ID NO: 2.

(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 293 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly Phe Leu His Ser
1 5 10 15

Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro Ala Leu Asn Lys
20 25 30

Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Asp
35 40 45

Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met Ala Ile Tyr Lys
50 55 60

Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu
65 70 75 80

Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His Leu Ile Arg
85 90 95

Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp Arg Asn Thr Phe
100 105 110

Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Val Gly Ser Asp
115 120 125

Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly
130 135 140

Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser
145 150 155 160

Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val Arg Val Cys Ala
165 170 175

Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Leu Arg Lys Lys
180 185 190

22.07.96

Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr Lys Arg Ala Leu
195 200 205

Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro Leu Asp
210 215 220

Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu Arg Phe Glu Met
225 230 235 240

Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala Gln Ala Gly
245 250 255

Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys Ser Lys
260 265 270

Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met Phe Lys Thr Glu
275 280 285

Gly Pro Asp Ser Asp
290

(2) Informace pro SEQ ID NO: 3.

(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 2066 párů basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

GAAAACTTAC CAGGGCAACT ATGGCTTCCA CCTGGGCTTC CTGCAGTCTG GGACAGCCAA 60

GTCTGTTATG TGCACGTACT CTCCTCCCCT CAATAAGCTA TTCTGCCAGC TGGCGAAGAC 120

GTGCCCTGTG CAGTTGTGGG TCAGCGCCAC ACCTCCAGCT GGGAGCCGTG TCCGCGCCAT 180

GGCCATCCAC AAGAAGTCAC AGCACTTGAC GGGGGTCGTG AGACGCTGCC CCCACCATGA 240

GCGCTGCTCC GATGGTGATG GCCTGGCTCC TCCCCAGCAT CTTATCCGGG TGGAAGGAAA 300

TTTGTATCCC GAGTATCTGG AAGACAGGCA GACTTTTCGC CACAGCGTGG TGGTACCTTA 360

TGAGCCACCC GAGGCCGGCT CTGAGTATAC CACCATCCAC TACAAGTACA TTTGTAATAG 420

22.07.98

CTCCTGCATG GGGGGCATGA ACCGCCGACC TATCCTTACC ATCATCACAC TGGAAGACTC 480

CAGTGGGAAC CTTCTGGGAC GGGACAGCTT TGAGGTTCGT GTTTGTGCCT GCCCTGGGAG 540

AGACCGCCGT ACAGAAGAAG AAAATTTCCG CAAAAAGGAA GTCCTTTGCC CTGAACTGCC 600

CCCAGGGAGC GCAAAGAGAG CGCTGCCCAC CTGCACAAGC GCCTCTCCCC CGCAAAAGAA 660

AAAACCACTT GATGGAGAGT ATTTCACCCT CAAGATCCGC GGGCGTAAAC GCTTCGAGAT 720

GTTCCGGGAG CTGAATGAGG CCTTAGAGTT AAAGGATGCC CATGCTACAG AGGAGTCTGG 780

AGACAGCAGG GCTCACTCCA GCTACCTGAA GACCAAGAAG GGCCAGTCTA CTTCCCGCCA 840

TAAAAAAACA ATGGTCAAGA AAGTGGGGCC TGACTCAGAC TGACATTCTC CACTTCTTGT 900

TCCCCACTGA CAGCCTCCCA CCCCCATCTC TCCCTCCCCT GCCTTTTGGG TTTTGGGTCT 960

TTGAACCCTT GCTTGCAATA GGTGTGCGTC AGAAGCACCC AGGACTTCCA TTTGCTTTGT 1020

CCCGGGGCTC CACTGAACAA GTTGGCCTGC ACTGGTGTTT TGTTGTGGGG AGGAGGATGG 1080

GGAGTAGGAC ATACCAGCTT AGATTTTAAG GTTTTTACTG TGAGGGATGT TTGGGAGATG 1140

TAAGAAATGT TCTTGCAGTT AAGGGTTAGT TTACAATCAG CCACATTCTA GGTAGGGGCC 1200

CACTTCACCG TACTAACCAG GGAAGCTGTC CCTCACTGTT GAATTTTCTC TAACTTCAAG 1260

GCCCATATCT GTGAAATGCT GGCATTTGCA CCTACCTCAC AGAGTGCATT GTGAGGGTTA 1320

ATGAAATAAT GTACATCTGG CCTTGAAACC ACCTTTTATT ACATGGGGTC TAGATGACCC 1380

CCTTGAGGTG CTTGTTCCCT CTCCCTGTTG GTCGGTGGGT TGGTAGTTTC TACAGTTGGG 1440

CAGCTGGTTA GGTTGAGGTA GTTGTCAGGT CTCTGCTGGC CCAGCGAAAT TCTATCCAGC 1500

CAGTTGTTGG ACCCTGGCAC CTCAAATGAA ATCTCACCCT ACCCCACACC CTGTAAGATT 1560

CTATCTCTTG TATAGATGAT CTGGATCCAC CAAGACTTGT TTTAGCTCAG GGTCCAATTT 1620

CTTTTTTCTT TTTTTTTTTT TTTTTCTTTT TCTTTGAGAC TGGGTCTCTT TGTTGCCCCA 1680

22.07.98

GGCTGGAGTG GAGTGGCGTG ATCTGGCTTA CTGCAGCCTT TGCCTCCCCG GCTCGAGCAG 1740

TCCTGCCTCA GCCTCCGGAG TAGCTGGGAC CACAGGTTCA TGCCACCATG GCCAGCCAAC 1800

TTTTGCATGT TTTGTAGAGA TGGGGTCTCA CAGTGTTGCC CAGGCTGGTC TCAAACTCCT 1860

GGGCTCAGGC GATCCACCTG TCTCAGCCTC CCAGAGTGCT GGGATTACAA TTGTGAGCCA 1920

CCACGTCCAG CTGGAAGGGC CTACTTTCCT TCCATTCTGC AAAGCCCTGC TGCATTTATC 1980

CACCCCACCC TCCACCTGTC TCCCTCTTTT TTTCTTACCC CTTTTTATAT ATCAATTTCT 2040

TATTTTACAA TAAAATTTTG TTATCA 2066

(2) Informace pro SEQ ID NO: 4.

(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 293 aminokyselin
(B) Typ: aminokyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

Lys Thr Tyr Gln Gly Asn Tyr Gly Phe His Leu Gly Phe Leu Gln Ser
1 5 10 15

Gly Thr Ala Lys Ser Val Met Cys Thr Tyr Ser Pro Pro Leu Asn Lys
20 25 30

Leu Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln Leu Trp Val Ser
35 40 45

Ala Thr Pro Pro Ala Gly Ser Arg Val Arg Ala Met Ala Ile His Lys
50 55 60

Lys Ser Gln His Met Thr Gly Val Val Arg Arg Cys Pro His His Glu
65 70 75 80

Arg Cys Ser Asp Gly Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln His Leu Ile Arg
85 90 95

Val Glu Gly Asn Leu Tyr Pro Glu Tyr Leu Glu Asp Arg Gln Thr Phe
100 105 110

22.07.98

Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu Ala Gly Ser Glu
115 120 125

Tyr Thr Thr Ile His Tyr Lys Tyr Ile Cys Asn Ser Ser Cys Met Gly
130 135 140

Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr Leu Glu Asp Ser
145 150 155 160

Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val Arg Val Cys Ala
165 170 175

Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn Phe Arg Lys Lys
180 185 190

Glu Val Leu Cys Pro Glu Leu Pro Pro Gly Ser Ala Lys Arg Ala Leu
195 200 205

Pro Thr Cys Thr Ser Ala Ser Pro Pro Gln Lys Lys Lys Pro Leu Asp
210 215 220

Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Lys Ile Arg Gly Arg Leu Arg Phe Glu Met
225 230 235 240

Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala His Ala Thr
245 250 255

Glu Glu Ser Gly Asp Ser Arg Ala His Ser Ser Tyr Leu Lys Ser Lys
260 265 270

Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Thr Met Val Lys Lys Val
275 280 285

Gly Pro Asp Ser Asp
290

(2) Informace pro SEQ ID NO: 5.

22.07.98

(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 17 párů basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

ACTGCCCAAC AACACCA 17

(2) Informace pro SEQ ID NO: 6.

(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 17 párů basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 6:

GCCACGCCCA CACATTT 17

(2) Informace pro SEQ ID NO: 7:

(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 20 párů basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 7:

22.07.98

GCCTGTCCTG GGAGAGACCG 20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 8:

(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 20 párů basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 8:

CCCTTAAGCC ACGCCCACAC 20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 9:

(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 18 párů basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 9:

CACTGCCCAA CAACACCA 18

(2) Informace pro SEQ ID NO: 10:

(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 17 párů basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

22.07.98

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 10:

GCCACGCCCA CACATTT 17

(2) Informace pro SEQ ID NO: 11:

(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 20 párů basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 11:

GGTGCATTGG AACGCGGATT 20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 12:

(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 20 párů basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 12:

GGGGACAGAA CGTTGTTTTC 20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 13:

(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 20 párů basí

22.07.96

(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 13:

ACGGATTTGG TCGTATTGGG 20

(2) Informace pro SEQ ID NO: 14:

(i) Charakteristika sekvence:
(A) Délka: 20 párů basí
(B) Typ: nukleová kyselina
(C) Řetězec: jednoduchý
(D) Topologie: lineární

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 14:

TGATTTTGGA GGGATCTCGC 20

22.07.98
PV1657-98
44770

Patentové nároky

1. Způsob pro léčbu subjektu s malignitou charakterizovanou expresí funkční p53 molekuly, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje kroky:

a) poskytnutí expresního konstruktu obsahujícího promotor funkční v eukaryotických buňkách a polynukleotid kodující p53, kde uvedený polynukleotid je umístěn "sense" a pod kontrolou uvedeného promotoru; a

b) provedení kontaktu uvedeného expresního konstruktu s nádorovou buňkou in vivo.

2. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou malignitou je spinocelulární karcinom.

3. Způsob podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený spinocelulární karcinom je karcinom hlavy a krku.

4. Způsob podle nároků 1, 2 nebo 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že endogenní p53 uvedené nádorové buňky je mutovaný.

5. Způsob podle nároků 1, 2 nebo 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že endogenní p53 uvedené nádorové buňky je přirozeného typu.

6. Způsob podle jakéhokoliv z předchozích nároků v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený expresní konstrukt je virový vektor.

22.07.98

7. Způsob podle nároku 6 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený virový vektor je vybrán ze skupiny skládající se z retrovirového vektoru, adenovirového vektoru a adeno-asociovaného virového vektoru.

8. Způsob podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m, že virový vektor je replikace-deficientní adenovirový vektor.

9. Způsob podle nároku 8 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený replikace-deficientní adenovirový vektor postrádá alespoň část E1 regionu.

10. Způsob podle nároku 9 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený promotor je CMV IE promotor.

11. Způsob podle jakéhokoliv z předchozích nároků v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným subjektem je člověk.

12. Způsob podle nároku 8 v y z n a č u j í c í s e t í m, že krok b) je opakován alespoň jednou.

13. Způsob podle nároku 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený nádor je po opakovaném kontaktování resekován a po resekci je provedeno další kontaktování.

14. Způsob podle nároku 13 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený expresní vektor je kontaktován v objemu od asi 3 ml do asi 10 ml.

15. Způsob podle nároků 12, 13 nebo 14 v y z n a č u j í c í

s e t í m, že množství adenoviru podané při každém kontaktování je mezi asi 10^7 a 10^{12} pfu.

16. Způsob podle jakéhokoliv z předchozích nároků v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené kontaktování je provedeno prostřednictvím nitronádorové injekce.

17. Způsob podle jakéhokoliv z nároků 1 až 15 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené kontaktování je provedeno prostřednictvím injekce do přirozené nebo do arteficiální tělní dutiny.

18. Způsob podle nároku 17 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená injekce zahrnuje kontinuální perfusi uvedené přirozené nebo arteficiální tělní dutiny.

19. Způsob podle nároků 17 nebo 18 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené kontaktování je provedeno pomocí injekce do arteficiální tělní dutiny vzniklé po excisi nádoru.

20. Způsob podle jakéhokoliv z předchozích nároků v y z n a č u j í c í s e t í m, že p53 kodující polynukleotid je opatřen připojeným úsekem, takže exprese p53 z uvedeného expresního vektoru může být detekována.

21. Způsob podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený připojený úsek je pokračující epitop.

22. Způsob pro určení účinosti terapie na mikroskopický zbytkový karcinom v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

a) dodání hlodavce s incisí do podkožní tkáně;

b) implantaci nádorových buněk do uvedené incise;

c) léčbu uvedeného hlodavce terapeutickým režimem; a

d) hodnocení vlivu uvedeného režimu na vznik nádorů.

23. Způsob podle nároku 22 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená incise je uzavřena po kroku b) a před krokem c).

24. Způsob podle nároků 22 nebo 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený terapeutický režim obsahuje zavedení terapeutického přípravku do uvedené incise, kdy uvedená incise je znovu otevřena po uzavření a znovu uzavřena po zavedení uvedeného terapeutického přípravku.

25. Způsob podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený terapeutický přípravek obsahuje expresní konstrukt obsahující promotor funkční v eukaryotických buňkách a polynukleotid kodující p53, kde uvedený polynukleotid je umístěn "sense" a pod kontrolou uvedeného promotoru.

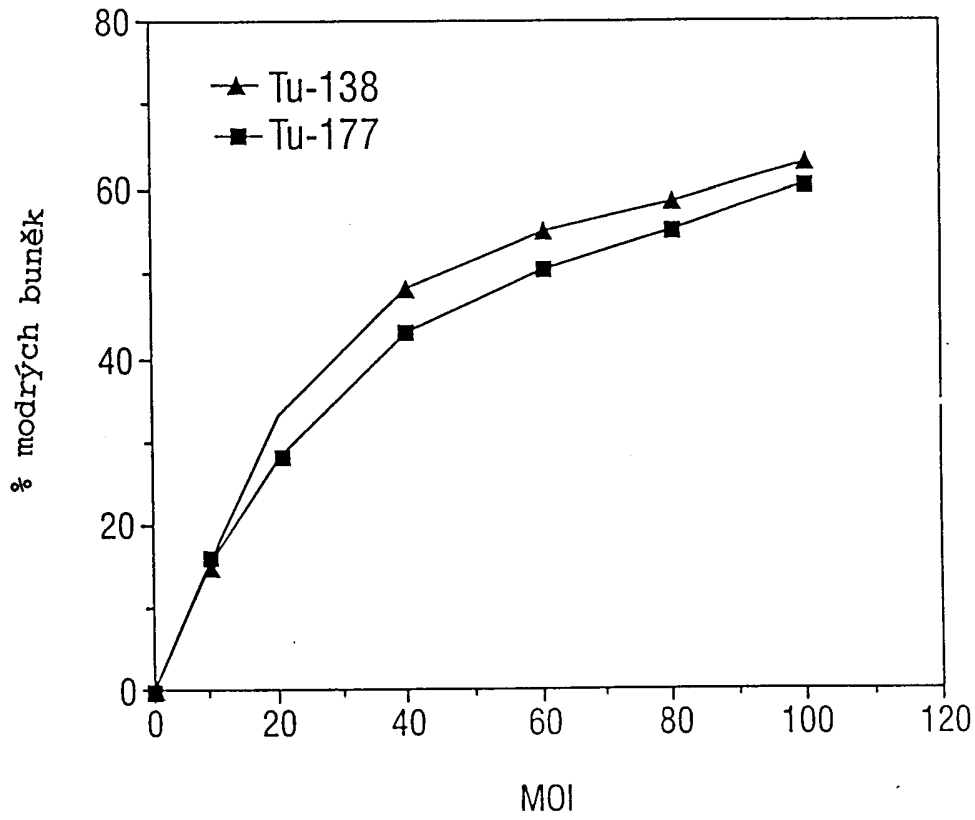
26. Způsob podle nároku 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený expresní konstrukt je replikace-deficientní adenovirus a uvedený promotor je CMV IE promotor.

27. Použití expresního konstruktu obsahujícího promotor funkční v eukaryotických buňkách a polynukleotid kodující p53, kde uvedený polynukleotid je umístěn "sense" a pod kontrolou uvedeného promotoru, pro výrobu léku pro léčbu subjektu s

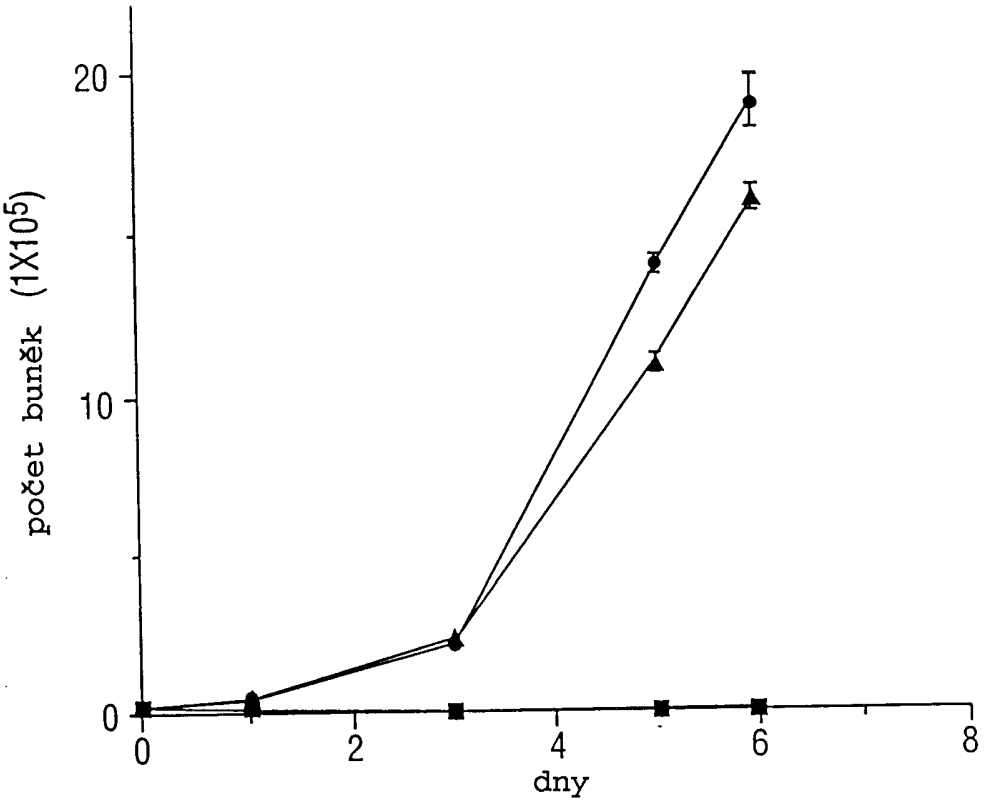
22.07.98

malignitou charakterizovanou expresí funkční p53 molekuly, kde léčba obsahuje krok kontaktování uvedeného expresního konstruktu s nádorovou buňkou in vivo.

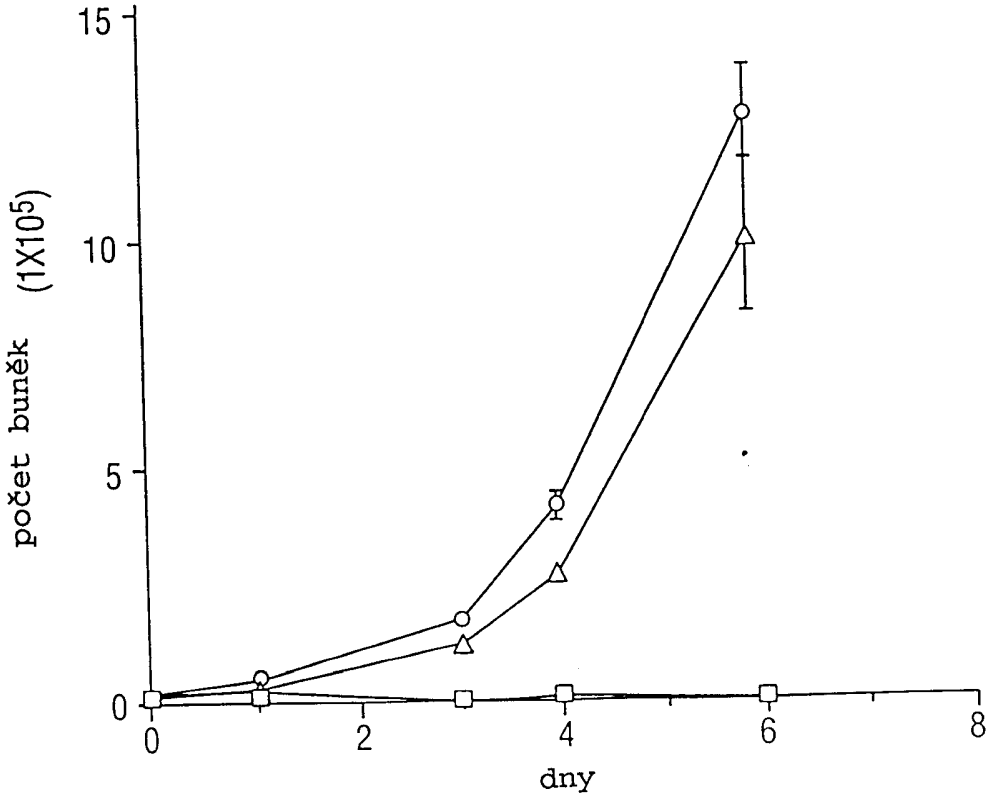
22.07.98 PV1657-98
44470



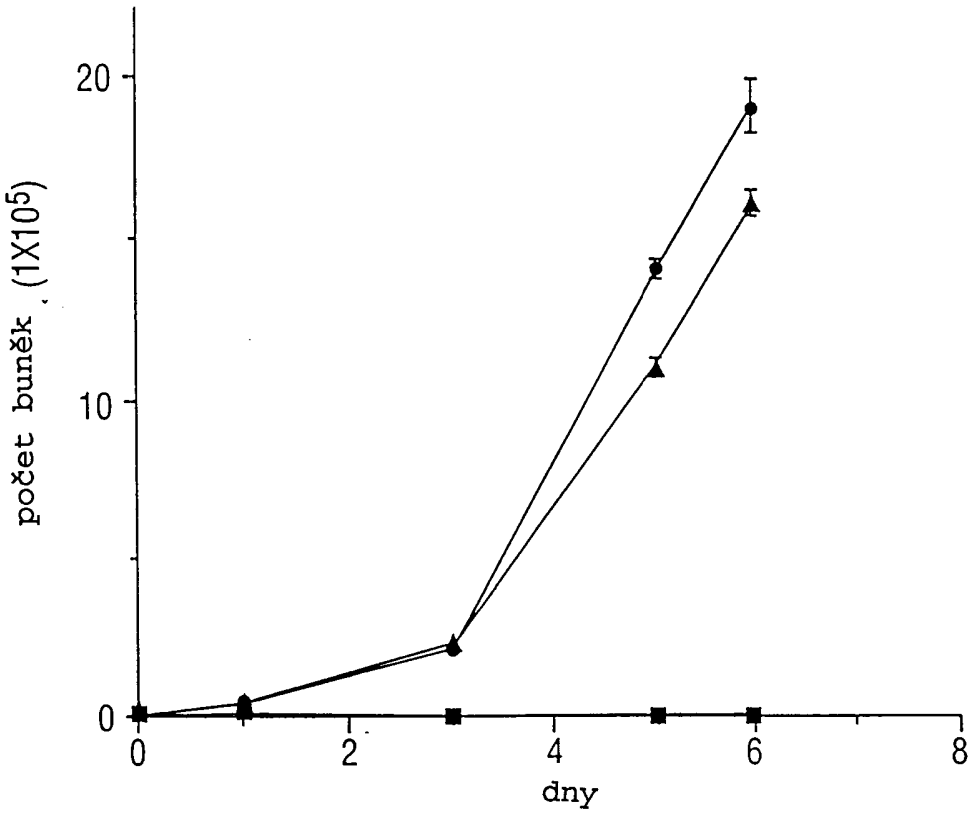
Obrázek . 1



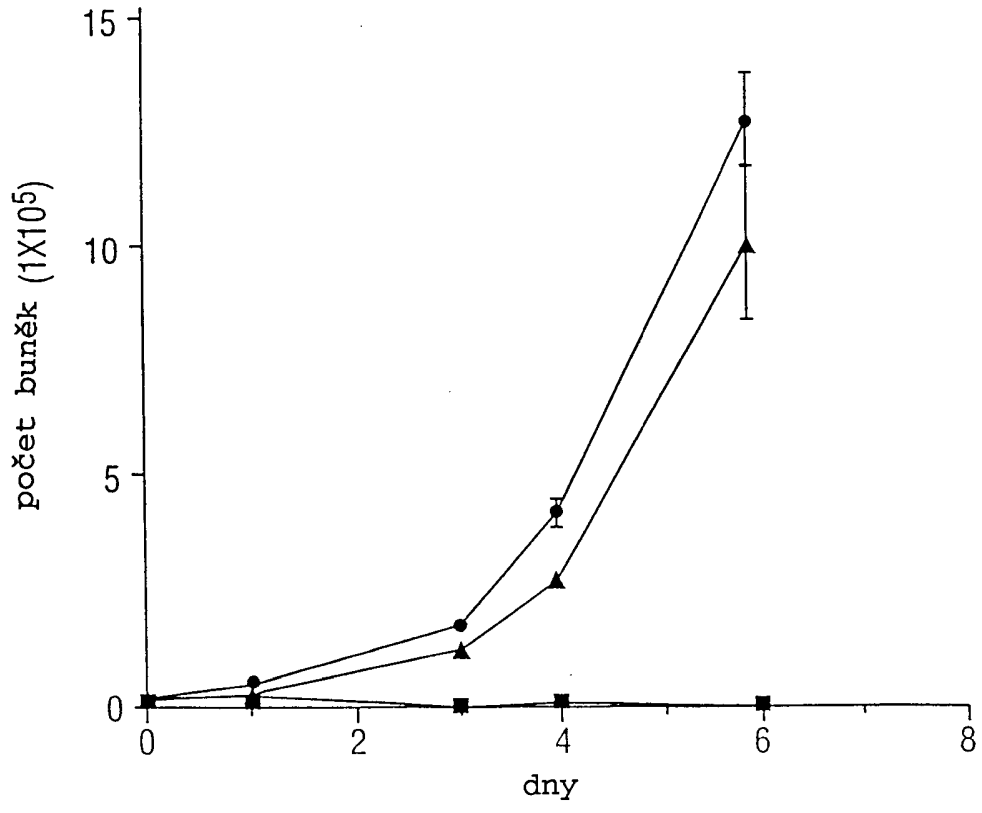
Obrázek 2A



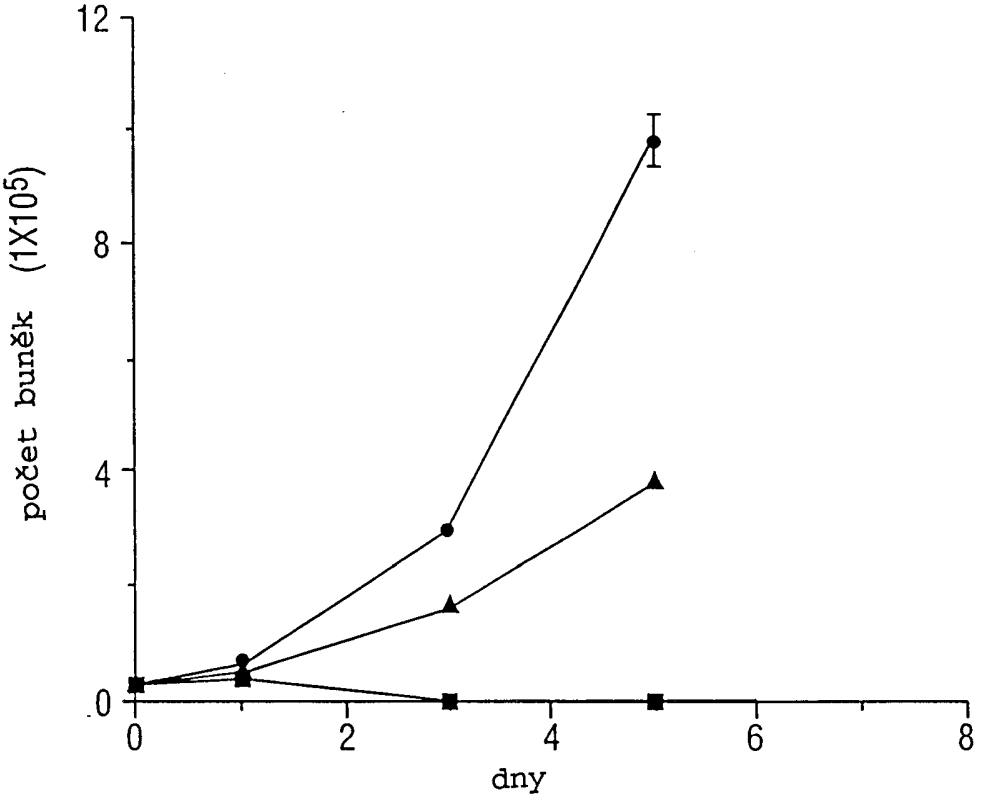
Obrázek 2B



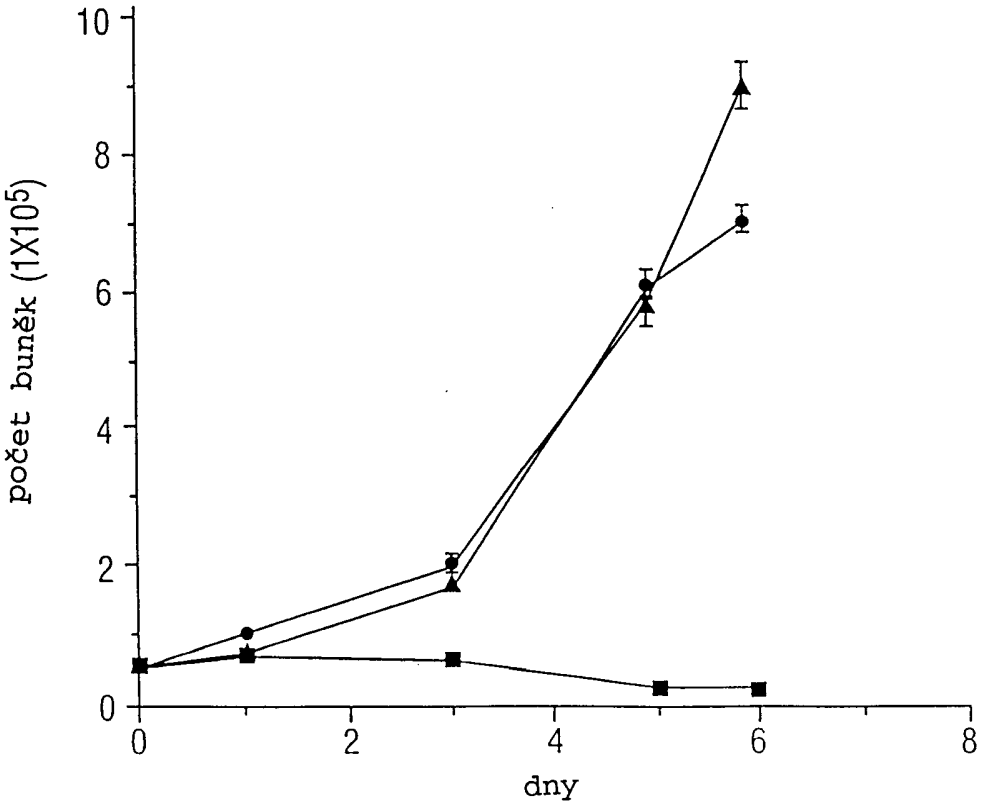
Obrázek 3A



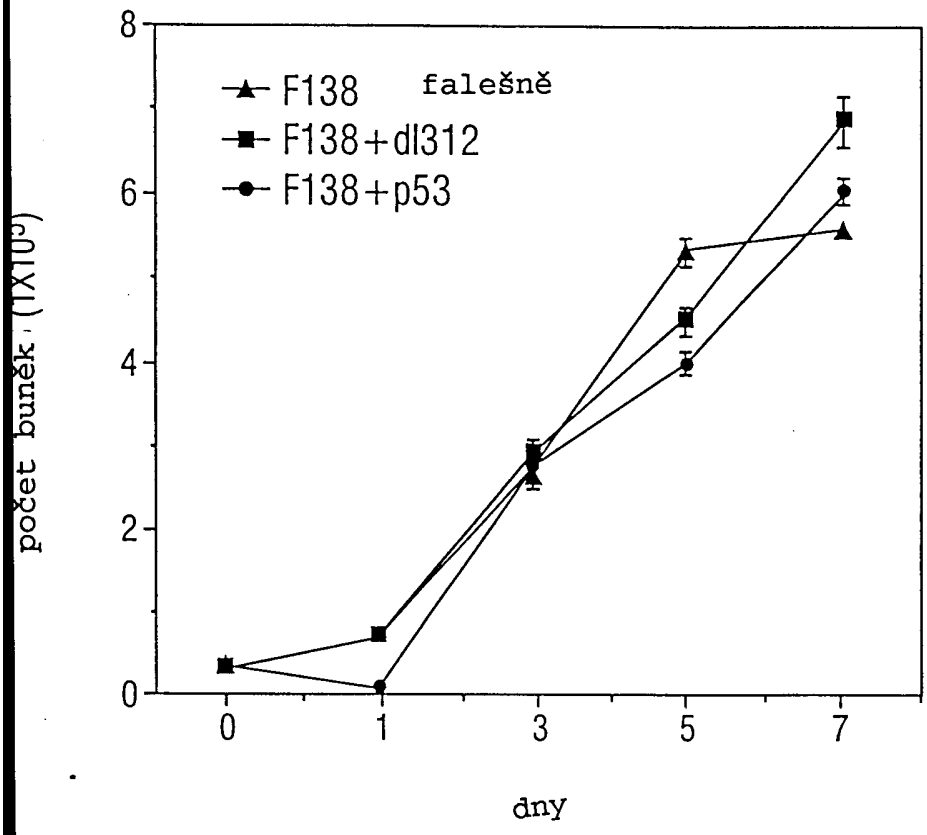
Obrázek 3B



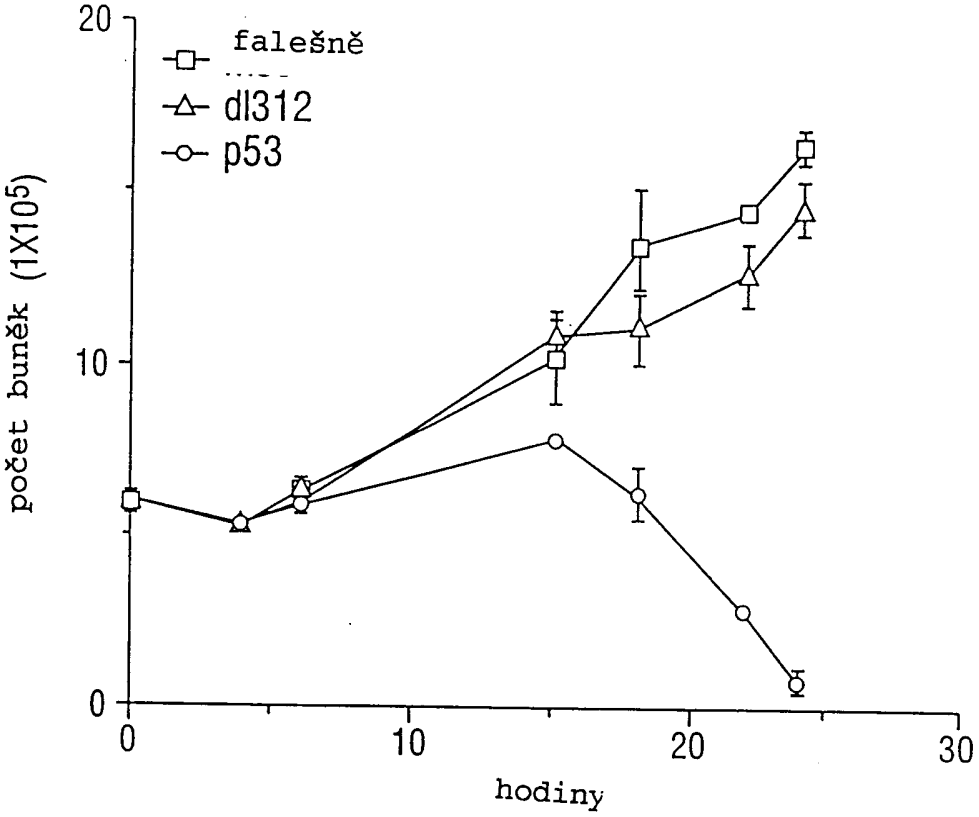
Obrázek 3C



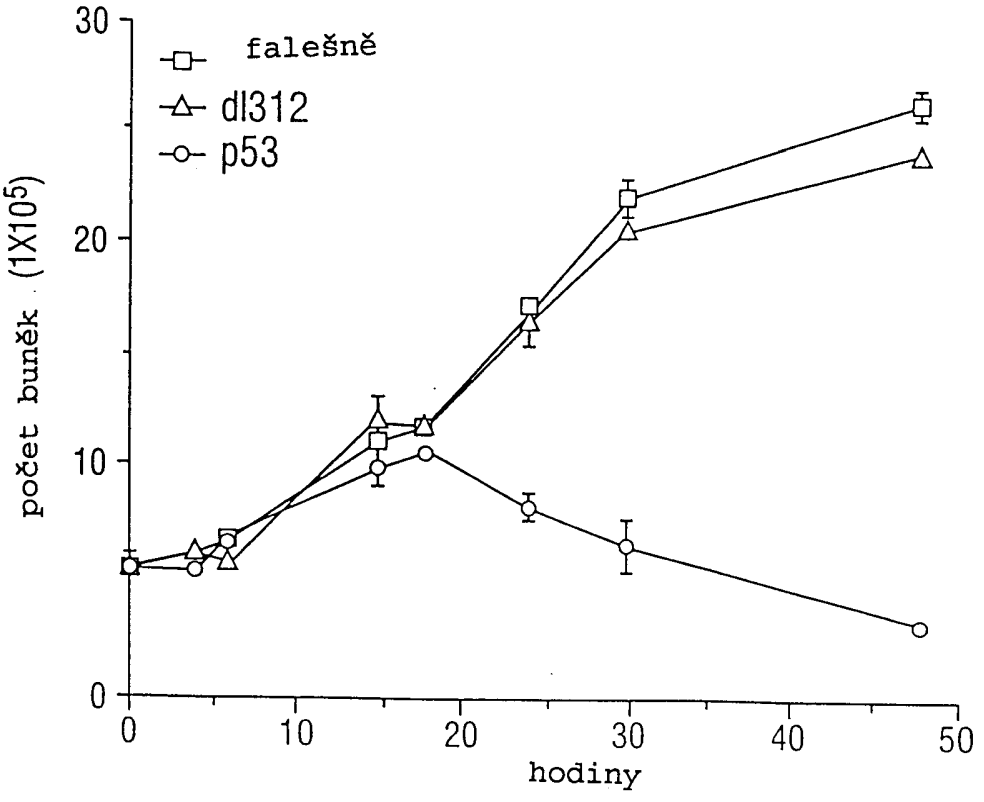
Obrázek 3D


F138 falešně
F138+dl312
F138+p53
počet buněk (1X10⁵)
0
2
4
6
8
0
1
3
5
7
dny

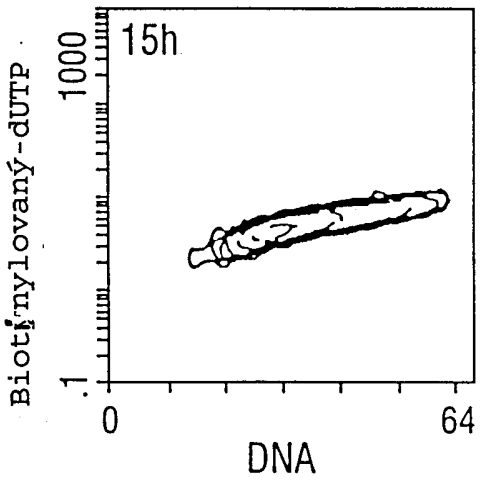
Obrázek 4



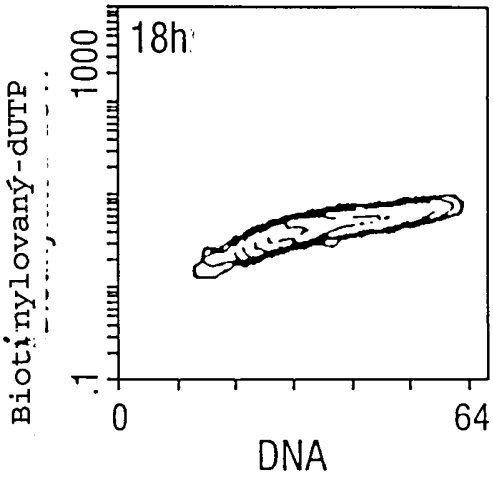
Obrázek . 5A



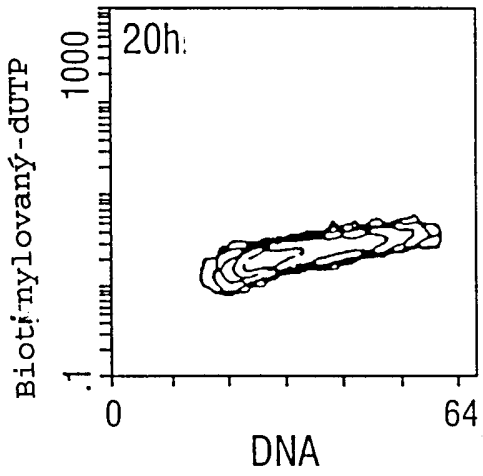
Obrázek . 5B



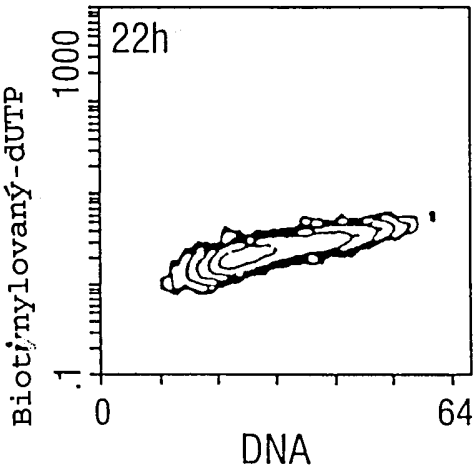
obrázek 6A1



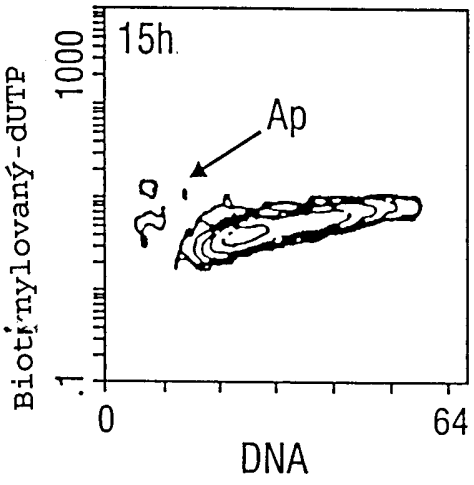
Obrázek 6A2



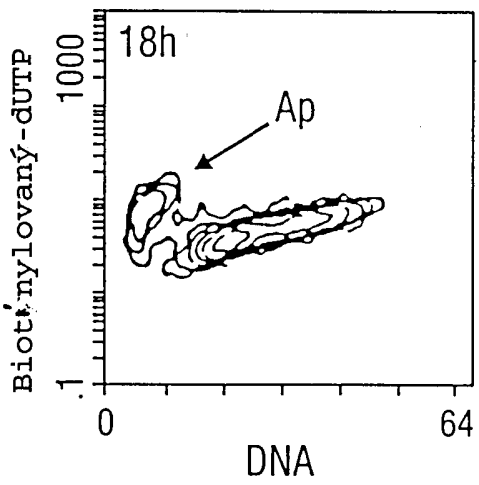
obrázek 6A3



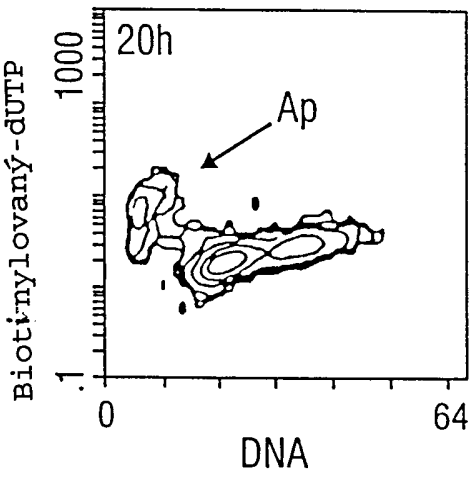
obrázek 6A4



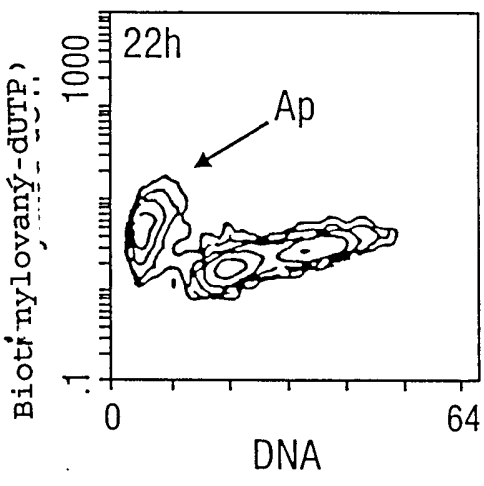
Obrázek 6A5



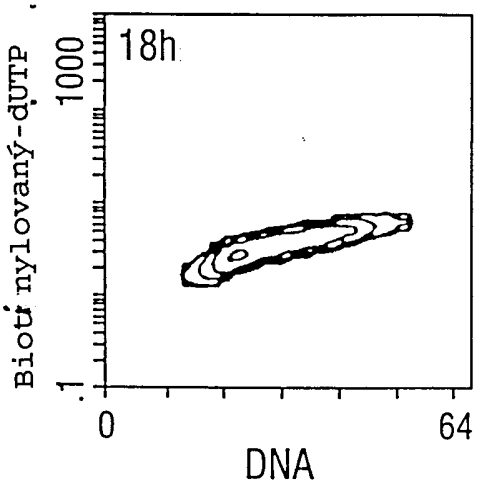
Obrázek 6A6



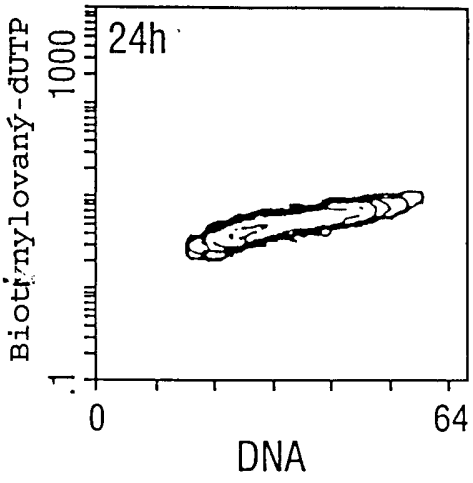
Obrázek 6A7



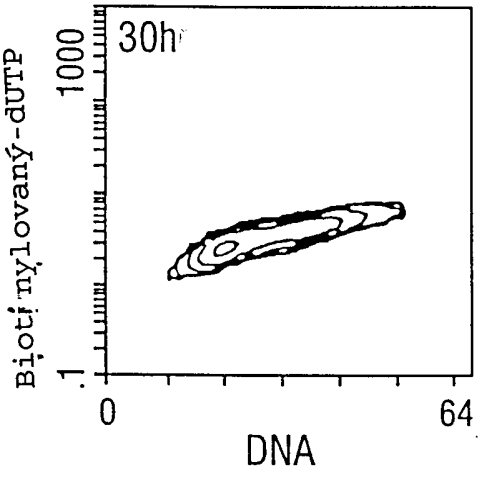
Obrázek 6A8



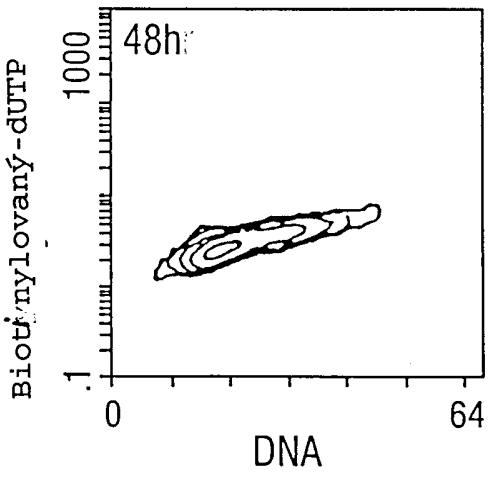
Obrázek . 6B1



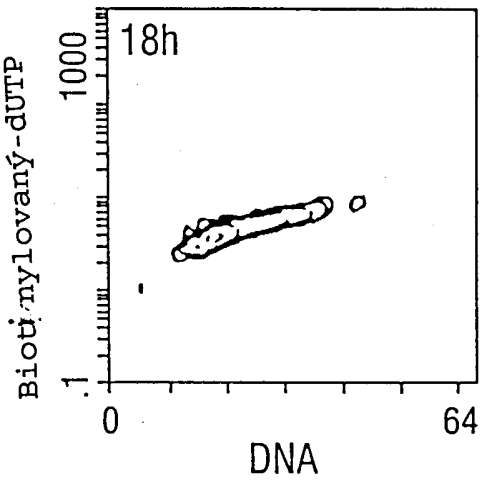
Obrázek . 6B2



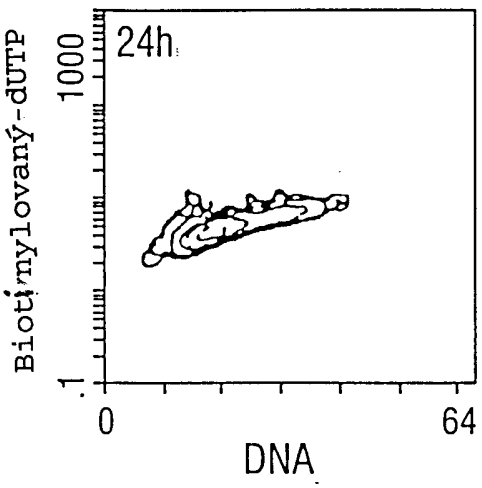
Obrázek . 6B3



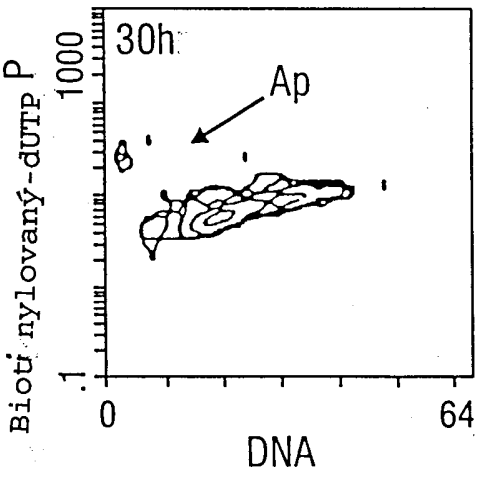
Obrázek . 6B4



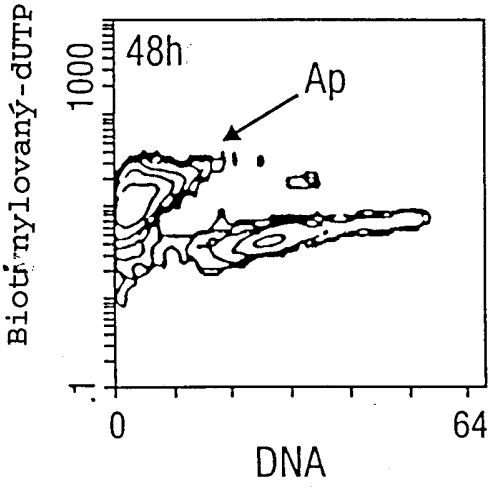
Obrázek. 6B5



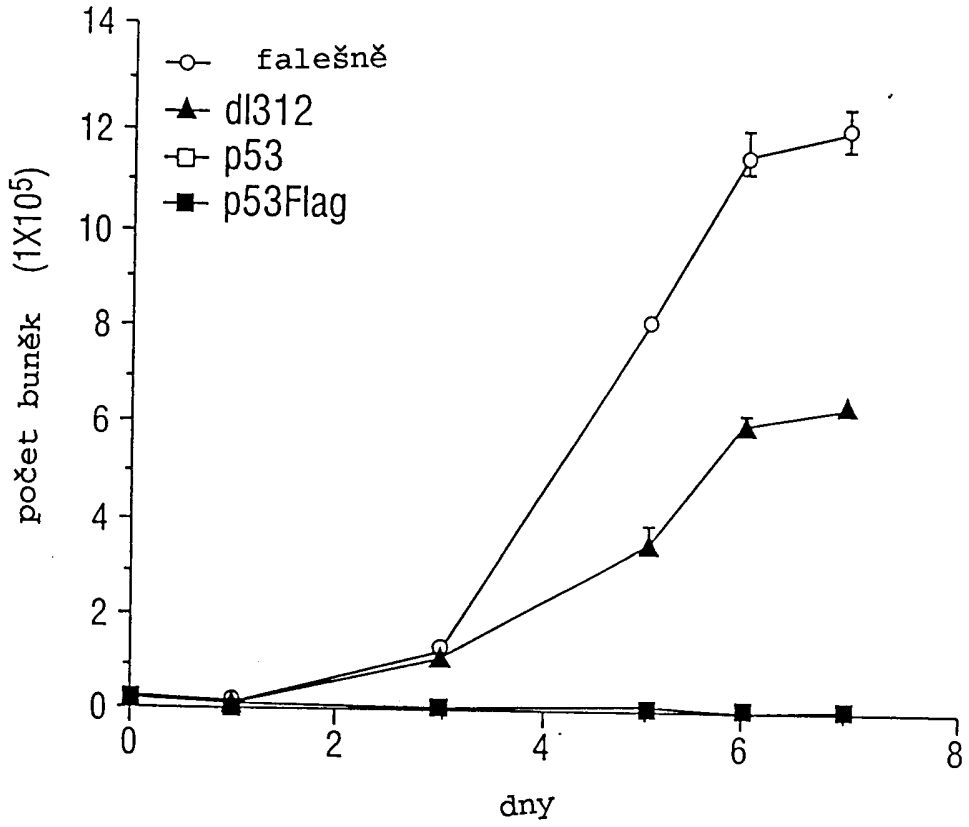
Obrázek. 6B6



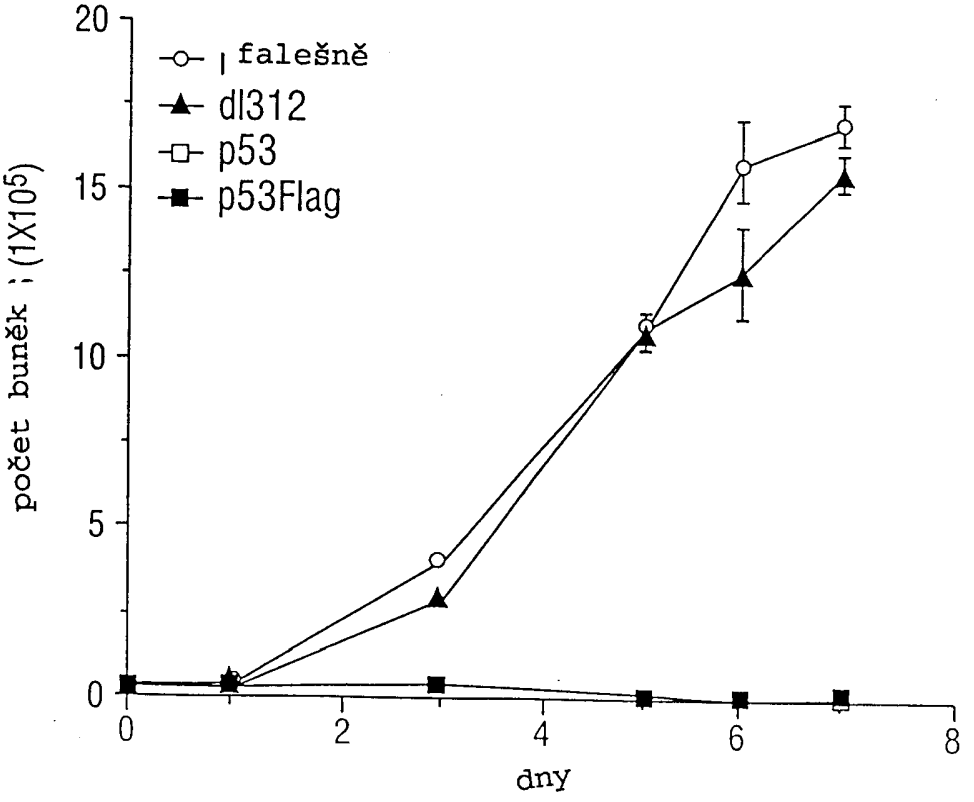
Obrázek. 6B7



Obrázek. 6B8



Obrázek 7A



Obrázek 7B