



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **314222**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

A 61 K 48/00

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19911690	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1989.10.30, PCT/US89/04808
(22) Inng. dag	1991.04.29	(85) Videreføringsdag	1991.04.29
(24) Løpedag	1989.10.30	(30) Prioritet	1988.10.31, US, 265829
(41) Alm. tilgj.	1991.06.25		
(45) Meddelt dato	2003.02.17		

(71) Patenthaver	The Regents of the University of California, 1320 Harbor Bay Parkway, Suite 150, Alameda, CA 94501, US
(72) Oppfinner	Wen-Hwa Lee, San Diego, CA 92130, US Huei-Jen Su Huang, San Diego, CA 92130, US Eva Y H P Lee, San Diego, CA 92130, US
(74) Fullmektig	Zacco Norway AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av en rekombinant viral partikkel for suppresjon av en neoplastisk fenotype**

(56) Anførte publikasjoner US 4736866, US 4497796
Science, 235, des. 1988, s. 1563-1566
Nature, 323, okt. 1986, s. 643-646
Science, 236, april 1987, s. 175-180
Cell, 44, 1986, s. 419-428
Proc. Natl. Acad. Sci., US, 83, 1986, s. 6563-6567
Cold Spring Harbor Symp. on Quantitative Biology, vol. L1, 1986, s. 1013-1019

(57) Sammendrag

Fremgangsmåte for genterapi for cancerformer der kromosomal beliggenhet til et inaktivt eller defekt cancersuppreserende gen er etablert, og et erstatnings- gen som er fortrinnsvis klonet blir anvendt for å erstatte det inaktive eller defekte cancersuppreserende genet i kromosomet. I tillegg til deres anvendelse i terapi er midler for profylaktisk behandling av individer som har en genetisk predisposisjon for cancer beskrevet og en dyremodell for testing av carcinogenisiteten overfor omgivende forbindelser er også beskrevet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører fremgangsmåte for fremstilling av en rekombinant viral partikkel.

5 Foreliggende oppfinnelse er utført med støtte fra regjeringen under Grant No. EY05758 med National Institute of Health, og University of California.

10 I mange år har cancer i dets mange former vært fryktinngytende for mennesker. I mange tilfeller blir tilstanden oppdaget når den patologiske tilstanden har nådd det punktet at pasientens liv ikke kan bli reddet og det fatale forløpet av sykdommen ikke kan bli reversert.

15 Noen cancertilstander kan dersom de blir diagnostisert og behandlet i tide bli stoppet ved dermed å forlenge livet til pasienten. Det er håpet om dette utfallet som motiverer cancerpasienter til å bruke mange penger på varierende former av cancerbehandling. På grunn av at cancer angriper organismen på det elementære, cellulære nivået, gjennom ukontrollert proliferasjon av celler, har behandling av cancer historisk vært dramatisk og ofte ødeleggende for organismen.

20 Mange behandlinger av cancer kan på grunn av at de er ment å virke dramatisk på det cellulære nivået noen ganger selv ødelegge friske celler. Ofte har destruksjon av et tilstrekkelig antall friske celler bidratt til, om ikke forårsaket, pasientens død. På grunn av at pasienten bare har døden som et alternativ er drastiske, dyre og livstruende behandlinger, så som røntgen og kjemoterapi, blitt anvendt.

25 Selv når slik behandling er vellykket forblir cancerpasienten utilpass og syk i lange tidsperioder etter at behandlingen er opphørt. Pasienten krever generelt hospitalisering, ikke bare i løpet av behandlingsperioden, men i lang tid deretter.

30 På grunn av dette har cancerspekteret forårsaket stor redsel hos mennesker. Det økonomiske tilsnittet, med hensyn på kostnader av medisinsk behandling, kombinert med den invalidiserende virkningen av sykdommen på de som lider har gjort forskningen for å oppnå pålitelige metoder for diagnostisering av ikke bare sykdommen, men også predisponeringen, og for behandling av sykdommen og/eller predisposisjonen meget signifikant.

35 Mye av fokuseringen på cancerforskning har vært på diagnostikk og behandling av tilstanden. I de senere årene, på grunn av fremskritt i kunnskap på de biokjemiske

prosessene på cellulært og subcellulært nivå, er oppmerksomheten blitt rettet mot metoder, ikke bare for diagnostisering og behandling av cancer, men også for oppdagelse av en predisposisjon for cancer i organismen. For å kunne bestemme en slik predisposisjon er studier blitt utført for å bestemme mekanismene i kroppen for undertrykking av

5 cancer.

I disse studiene ble "cancersuppresjon" opprinnelig definert som et tap av tumorgenisitet observert i fusjonsceller dannet av tumorceller og normale fibroblaster, lymfocytter eller keratinocytter. Effekten ble antatt å bli formidlet av dominante suppressive faktorer i normale celler, Nature 223:363 (1969) og J. Cell.Sci. 8:659 (1974).

10

Bevis indikerte at disse faktorene delvis var genetiske på grunn av at en korrelasjon eksisterte mellom suppresjon av tumorgenisiteten og tilstedeværelse av visse kromosomer i fusjonerte celler, Adv. Viral Oncol. 6:83 (1987). For eksempel Wilms tumor, en tumor i nyren til barn, antas å oppstå ved inaktivering av et gen på kromosom 11. Ved anvendelse av teknikken for mikrocellefusjonsmediert overføring av enkelte kromosomer, er det blitt demonstrert at introduksjon av et normalt kromosom 11 inn i Wilms tumorceller, suppresserte deres tumorgenisitet. Innføring av kromosomene X og 13 hadde derimot ikke denne effekten, Science 236:175 (1987).

20

På grunn av at hele humane kromosomer ble overført kunne cancersuppresjon ikke være fra molekylært definerte genetiske elementer. I tillegg kan overføring av hele humane kromosomer gi signifikante problemer når de blir prøvet på en annen basis enn den eksperimentelle. Preparering av egnede kromosomer for terapeutiske anvendelser er veldig nøyaktig, tidkrevende og dyr. Som et resultat har en slik teknikk ikke blitt funnet å være akseptabel for mange anvendelser. På grunn av dette vil det være meget ønskelig å ha en fremgangsmåte for å oppnå cancerbehandling bioteknologisk, både terapeutisk og profylaktisk, som ville løse slike problemer som er assosiert med innføring av kromosomer til pasienten.

30

En annen betydning for cancersuppresserende gener oppsto i sammenheng med genetiske studier på visse barneneoplasier, Cancer 35:1022 (1975) og Nature 316:330 (1985) og voksne tumorsyndromer Nature 328:614 (1987); ibid 332:85 (1988); ibid 329:246 (1987); ibid 322:644 (1986). Gener som bidrar til dannelsen av disse tumorene ser ut til å være onkogene ved tap av funksjon, og ikke aktivering, som for klassiske onkogener, Science 235:305 (1987); ibid 238:1539 (1987); Nature 323:582 (1986); Cancer Res. 46:1573 (1986).

35

- Retinoblastom, en barneøyecancer, utgjør det prototypiske eksempelet, *J. Cell.Biochem.* in press (1988). Ytterligere cytogenetiske analyser, *Am. J. Dis. Child.* 132:161 (1978); *Science* 208:1042 (1980); *J. Med. Genet.* 21:92 (1984) og studie av restriksjonsfragment-lengdepolymerase kjedepolymerase (RFLPs), *Nature* 305:779 (1983) foreslår at retinoblastom kan være et resultat av tap av et genlocus, betegnet RB eller RB-1, beliggende i kromosom 13q14. Et gen fra denne regionen med egenskaper i samsvar med RB-genet er blitt molekylært klonet, *Nature* 323:643 (1986); *Science* 235:1394 (1987), og *ibid* 236:1657 (1987). Ekspresjon av dette genet som et 4,7 kb mRNA transkript ble funnet i alle undersøkte normale vev, men var ikke detekterbare eller endrede retinoblastomceller, *Science* 235:1394 (1987) og mutasjonene innenfor RB-genet er blitt identifisert i mange tilfeller *Science*, 236:1657 (1987) og *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2210 (1988) og *ibid* 85:6017 (1988). Disse data foreslår at det klonede RB-genet ble tentativt identifisert.
- 15 Et proteinprodukt av RB-genet ble tidligere identifisert som et kjernefosfoprotein omtrent 110 kD (pp110^{RB}) ved anvendelse av antistoffer dannet mot valgte epitoper bestemt fra RB cDNA-sekvensen, *Nature* 329:642 (1987).
- I lys av beviset som etablerer cancersuppresjonsegenskapene til RB-genet er arbeid blitt utført for å anvende RB-genet for å bestemme mottageligheten til retinoblastom som et diagnostisk redskap. Disse diagnostiske fremgangsmåtene og produktene er beskrevet i inngitt US patentsøknad, serie nr. 108,748, som beskriver kloning, isolering, identifikasjon og sekvensering av RB-genet. I tillegg beskriver nevnte patentsøknad også fremgangsmåte for anvendelse av klonet retinoblastomgen cDNA som et redskap for diagnostisering av retinoblastom, osteosarcom og fibrosarcom.
- 30 I tillegg beskriver inngitte US-patentsøknad, serie nr. 098,612 et fosfoprotein ppRB¹¹⁰ som hovedsakelig beliggende i cellekjernen og som har DNA-bindingskapasitet. På samme måte som med RB mRNA ble dette proteinet detektert i mange typer av dyrkede humane celler. pp110^{RB} er blitt vist å danne en fast binding til store T-antigen og E1A, transformerende proteiner fra DNA-tumorvirusene SV40 og adenovirus, *Nature* 334:124 (1988); *Cell* 54:275 (1988). RB-genproduktet, eller et kompleks som inneholder dette, er blitt funnet å ha DNA-bindende aktivitet, *Nature* 329:642 (1987). Disse studiene foreslår indirekte at pp110^{RB} spiller en rolle i regulering av ekspresjonen av andre cellulære gener, og kan også formidle de onkogene virkningene av noen virale transformerende proteiner.
- 35

Mye av cancerforskningen er rettet mot deteksjon og en predisposisjon i organismen mot utvikling av cancer. Det ville derfor være meget ønskelig dersom en profylaktisk metode for cancerbehandling eksisterer slik at tumorgenese kunne bli stoppet før starten, eller viktigere, utelukkes fra å bli utviklet.

5

I dette henseendet er det i inngitte US-søknad, Serienr. 091,547 beskrevet fremgangsmåter for anvendelse av klonet humant esterase D cDNA som en genetisk markør som et diagnostisk redskap for retinoblastom, Wilsons sykdom og andre arvelige eller ervervede sykdommer kontrollert av gener beliggende på kromosom 13 13q:1411-regionen.

10 Patentsøknaden beskriver en esterase D cDNA probe for kloning av retinoblastomgenet og anvendelse av det klonede humane esterase cDNA som et prognoseredskap for å bestemme den genetiske predisposisjonen til retinoblastom eller Wilsons sykdom.

15 Til tross for at store fremskritt er blitt gjort når det gjelder utvikling av prognoseredskaper for bestemmelse av den genetiske predisposisjonen for cancer, utgjør terapeutisk og profylaktisk behandling av cancer de alvorligste ovennevnte begrensninger. I dette henseendet er prognoseredskapet ekstremt nyttig for screening av en populasjon, for å bestemme hvilke personer som kan være predisponert for cancer. Når en person blir bestemt å være predisponert ved hjelp av det diagnostiske redskapet, kan vedkommende
20 bli fulgt opp med korte intervaller for tidlige tegn og symptomer på cancer. Dersom tidlige tegn og symptomer blir funnet, kan hensiktsmessige prosedyrer, så som kirurgi, bli utført på et tidlig stadium.

På grunn av at anvendelse av diagnostiske redskaper for predisposisjon og for cancer er
25 meget fordelaktig er kunnskapen om en slik predisposisjon ikke til hjelp i situasjoner der det viser seg at en pasient ved konvensjonelle undersøkelsesteknikker har en fremadskridende cancer. I disse tilfellene har konvensjonelle prosedyrer og behandlinger ikke vist seg å være helt tilfredsstillende.

30 Det vil derfor være svært ønskelig å ha profylaktiske og/eller terapeutiske behandlinger for cancer, ved å anvende bioteknologiske teknikker. Det vil videre være viktig å ha slike bioteknologiske former, som er effektive mot mange forskjellige former av cancer, med små eller ingen bivirkninger. Det vil også være ønskelig å ha teknikker for å bevise at visse miljøforbindelser, så som sigarettøyk, forårsaker cancer. Ved å ha denne typen
35 av informasjon kan den også anvendes for å hjelpe mennesker å unngå å komme i kontakt med forbindelser som forårsaker cancer, det kan dermed bevises, istedenfor bare å antas at forbindelsene spiller en rolle i onkogenesen.

Foreliggende oppfinnelse omfatter en fremgangsmåte for fremstilling av en rekombinant viral partikkel for suppresjon av den neoplastiske fenotypen til en cancercelle som ikke har endogent villtype-retinoblastomprotein, som er kjennetegnet ved

- 5 i) å introdusere et villtype-retinoblastomgen eller et fragment derav, som koder for funksjonelt retinoblastom protein inn i en viral vektor ved å bruke en ligeringsmetode,
- ii) introdusere det rekombinante virale genomet inn i en celle, hvorved virale partikler blir produsert; og
- 10 iii) blande den virale partikkelen med en farmasøytisk akseptabel bærer.

En hensikt med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe generelt trygge og spesifikke terapeutiske og profylaktiske fremgangsmåter som er nyttige for kontrollering av cancersuppresjon.

15

En annen hensikt er å tilveiebringe fremgangsmåter for å kontrollere cancersuppresjon som er spesifikk for utrydding av cancertumor ved anvendelse av bioteknologiske fremgangsmåter og produkter.

- 20 Foreliggende oppfinnelse kan inngå i genterapi for cancerformer der den kromosomale beliggenheten til et inaktivt eller defekt cancersuppresserende gen blir etablert. Et erstatningsgen som fortrinnsvis blir klonet, blir deretter anvendt for å erstatte det inaktive eller defekte cancersuppresserende genet i kromosomet. I tillegg til dets anvendelse i terapi, kan foreliggende oppfinnelse inngå i en profylaktisk behandling av
- 25 individer som har en genetisk predisposisjon for cancer og tilveiebringer en dyremodell for testing for carcinogenitet av miljøpåvirkninger. Betegnelsen "innvirker" som anvendt her, skal forståes i vid betydning slik at betegnelsen innbefatter, men er ikke begrenset til, forskjellige former for bestråling og forskjellige typer av forbindelser som finnes i miljøet.

30

Foreliggende oppfinnelse kan anvendes for behandling av cancer og reduserer nødvendigheten av bestråling og/eller kjemoterapi. Den kan videre bli anvendt på et meget tidlig stadium, etter at en genetisk predisposisjon for cancer er blitt oppdaget, men før begynnelsen på tumorgenese.

35

En ytterligere fordel ifølge foreliggende oppfinnelse er at den anvender genetiske materialer som er mindre enn hele kromosomer og er generelt mer stabile og kan lettere bli

klonet.

Da fremgangsmåten beskrevet heri ble oppfunnet, ble det fremsatt en hypotese om at dersom den neoplastiske adferden til tumorcellene ble suppressert av et intakt RB-gen, kunne RB-geninaktiveringen være en viktig hendelse i løpet av tumorgenese.

Det er enda usikkert om inaktivering av en eller flere cancersupprimerende gener i en celle er tilstrekkelig for å forårsake cancer, men erstatning av inaktiverede suppresserende gener i tumorceller er en ny tilnærmingstype for behandling av ondartet sykdom. Ulik konvensjonelle, cytotoxiske cancerterapier bygger genterapi på permanent oppretting av en underliggende defekt i tumorcellene. Videre kan genterapi bli anvendt profylaktisk på grunn av at cancersupprimerende gener ikke skader normale celler.

Hensikter og trekk ifølge oppfinnelsen og måter for å oppnå dem vil fremkomme med referanse til følgende beskrivelse av utførelsesformen ifølge oppfinnelsen i sammenheng med vedlagte figurer, det samme vil gjelde forståelsen av oppfinnelsen, hvori:

Fig. 1A og fig. 1B viser fremgangsmåter for produksjon av RB-virus og Lux-virus; Fig. 2A er et kromatogram som viser tilstedeværelse av RB-protein i normal størrelse i cellelinjer etter infeksjon med RB-virus og G418-seleksjon; figurene 2Ba og 2Bb viser fotografier av opprinnelige RB-proteiner lokalisert i kjernen i U-20S-cellene; figurene 3A-3F viser kulturer av RB og Lux-virusinfiserte tumorceller etter G418-seleksjon; figurene 4A og 4B viser grafer av WERI-Rb27, Saos-2 og U-20S cellekolonivekst over en fem dagers periode; og fig. 5 er en kromatograf som viser tap av RB-proteinekspressjon i ni Saos-2 kloner.

Alle referanser som er sitert i søknaden er inkorporert som referanse og er del av søknaden.

Den detaljerte beskrivelsen er oppstilt ifølge følgende oppstilling:

A. INTRODUKSJON

B. INITIELLE TRINN FOR IDENTIFISERING AV CANCERSUPPRESSERENDE GENER

B1. IDENTIFIKASJON AV MARKØRGEN

B2. KARTLEGGING AV ESD-GENET

- B3. KLONING AV ESTERASE D-GENET
- C. ONKOGENISITETENS GENETIKK OG KLONING AV
CANCERSUPPRESSERENDE GEN
 - C1. RETINOBLASTOMETS GENETIKK
 - 5 C2. MOLEKYLÆR KLONING AV GENER FRA KROMOSOMREGION
13q14
 - C3. IDENTIFIKASJON AV RB-GENET VED KROMOSOM VANDRING
 - C4. RB-GENET I ANDRE CANCERE
 - C5. KLONING AV RB-GENET
 - 10 C6. ONKOGENISITETEN AV MUTANTE RB-GENER
- D. DIAGNOSTISKE PROSEDYRER SOM ANVENDER CANCER-SUPPRES-
SERENDE GENPRODUKTER
 - D1. DIAGNOSTISKE PROSEDYRER FOR BESTEMMELSE AV CANCER-
PREDISPOSISJON
 - 15 D2. IDENTIFIKASJON OG FUNKSJON AV RB-PROTEINET
 - D3. LOKALISERING OG FUNKSJON AV ppRB¹¹⁰
 - D4. REGULATORISK FUNKSJON AV ppRB¹⁰
 - D5. ppRB¹¹⁰ SOM ET DIAGNOSTISK REDSKAP
- E. GENTERAPI OG PROFYLAKSE
 - 20 E1. PRODUKSJON AV Rb OG LUX-VIRUSINFEKSJON AV
TUMORCELLELINJER
 - E2. ANVENDELSE AV RB-GENET I CANCERSUPPRESJON
 - E3. SUPPRESJON AV ONKOGENISITETEN *IN VITRO* OG *IN VIVO* VED
RB-GENET E4
 - 25 E4. TRANSFORMASJON VED INAKTIVERING AV RB-GENER
- F. DYREMODELLER FOR Å EVALUERE ANTATTE MILJØPÅVIRKNINGER
PÅ CARCINOGENISITET

A. INTRODUKSJON

- 30 Foreliggende oppfinnelse vedrører fremgangsmåte for fremstilling av en rekombinant
viral partikkel som kan anvendes i diagnostikk og behandling av cancer for å tilveie-
bringe teknikker for å bestemme carcinogeniteten av miljøpåvirkninger. De diagnostiske
teknikkene er basert på å bestemme en pasients mottagelighet overfor cancer, i noen
tilfeller også før en cancerfenotype er uttrykt. De diagnostiske fremgangsmåtene innbe-
35 fatter generelt bestemmelse av det kromosomale locuset til et cancersuppresserende gen.
Etter at locuset er blitt bestemt er det utviklet teknikker for å bestemme om det cancer-
suppresserende genet er tilstede eller fraværende, og dersom det er tilstede, om det

cancersuppresserende genet er fullstendig funksjonelt.

Etter at locuset til det cancersuppresserende genet er blitt bestemt og genet er funnet å være tilstede, kan funksjonen til genet bli bestemt ved observasjon av fenotypisk ekspresjon av genet under kontrollerte betingelser. En teknikk for vurdering av fenotypisk ekspresjon er å teste for tilstedeværelse av produktet til det cancersuppresserende genet. En foretrukket teknikk er å danne et antistoff for genproduktet som kan danne et immunkompleks med produktet for derved å tilveiebringe en nøyaktig test for tilstedeværelse og mengde av proteinet til genproduktet i en vevsprøve.

10

Etter at kromosombeligheten til det cancersuppresserende genet er blitt bestemt, kan selve genet bli klonet og deretter anvendt som et farmasøytisk produkt. I dette henseendet har det klonede cancersuppresserende genet en anvendelse i tillegg til dets terapeutiske anvendelser siden det også kan bli anvendt profylaktisk. I dette henseendet kan cancersuppresserende genfunksjon bli bestemt før en ekspresjon av cancerfenotypen i individet og, dersom genmangel eller -fravær blir bestemt, kan et friskt klonet cancersuppresserende gen bli anvendt profylaktisk istedenfor det fraværende eller defekte genet.

15

I tillegg kan produksjon av en musemodell anvendes som er blitt genetisk endret slik at modellen kan bli brukt som en pålitelig fremgangsmåte for å vurdere carcinogeniteten av innvirkninger fra omgivelsene så som tobakksrøyk, konserveringsmidler i mat, sukersubstitutter og lignende.

20

Foreliggende oppfinnelse bygger på spesifikke eksempler av oppfinnelsene beskrevet og fremsatt i kravene i de tidligere nevnte US-patentsøknadene. Oppfinnelsen beskrevet heri og de som er beskrevet i søknadene er basert på mengden av vitenskapelig bevis som tyder på at carcinogenesen på en eller annen måte er knyttet til genetiske endringer og tumorceller. Disse endringene kan være forårsaket av mutasjon, geninaktivering, suppresjon, delesjon eller andre årsaker.

30

Spesifikke, relevante aspekter av inngitte søknader vil bli diskutert i detalj nedenfor, men det er viktig nå å oppsummere hvordan hver representerer et progressivt trinn i etableringen av foreliggende oppfinnelse.

35

Foreliggende oppfinnelse, og de som er beskrevet i inngitte søknader, er basert på mengden av vitenskapelige bevis som indikerer at carcinogenesen er assosiert med

genetiske endringer i tumorceller. Disse endringene kan være forårsaket av mutasjon, geninaktivering, suppressjon, delesjon eller andre årsaker.

- Med genetisk endring som den hypotetiske årsaken til carcinogenese, er det viktig å etablere locuset og årsaken for genetiske endringer. Det er i tillegg viktig å finne måter som kan forhindre slike genetiske endringer ved profylaktiske målinger. Utvikling av modeller, så som dyremodeller, for å teste for carcinogenitet av påvirkninger fra omgivelsene, vil være nyttig.
- 5 Ved å se nærmere på den diagnostiske fremgangsmåten begynte det med identifikasjon av aminosyresekvensen til human esterase D og nukleotidsekvensen til esterase D cDNA. Esterase D er viktig på grunn av at dets genetiske locus faller sammen med beliggenheten til retinoblastomgenet (RB). Klonet esterase cDNA er dermed nyttig som en genetisk markør og som et diagnostisk redskap for retinoblastom, Wilsons sykdom og andre arvelige eller ervervede sykdommer som blir kontrollert av gener beliggende i kromosom 13 13q14:11-regionen.
- 10
- 15

- I tillegg til dets anvendelse som et diagnostisk redskap er klonet esterase cDNA nyttig som en probe for å klon RB, og som et prognostisk redskap for retinoblastom, Wilsons sykdom og andre sykdommer kontrollert av genene beliggende i kromosom 13 13q14:11-regionen.
- 20

- På grunn av at esterase D og retinoblastomgenet er beliggende i samme kromosomale region var evalueringen av RB-genfunksjonen og dets kromosomale mønster mulig.
- 25 Ved kromosomvandring, ved anvendelse av esterase D cDNA klon som utgangspunkt, ble RB-genet isolert og dets nukleotidsekvens bestemt.

- Det antas at RB-genet har en regulatorisk funksjon og at tilstedeværelsen og den normale funksjonen forhindrer utviklingen av retinoblastom. Fravær, feilfunksjon eller inaktivering av RB-genet forårsaker derimot utvikling av, eller genetisk predisposisjon og mottagelighet for retinoblastom. Det antas videre at RB-genfravær, feilfunksjon eller inaktivering er hovedårsaken, ikke bare for arvelig og ervervet retinoblastom men også for andre cancertyper.
- 30
- 35 Identifikasjon av den nøyaktige RB-genbeliggenheten og isolering, identifikasjon, sekvensering og kloning av RB-genet muliggjorde diagnostikk og behandling av retinoblastomer og deres sekundære tumorer. Det er også tilveiebrakt en fremgangsmåte for

diagnostikk og behandling av andre cancere relatert til RB-genfunksjonene.

Ved å ta i betraktning den diagnostiske fremgangsmåten oppsto et fremskritt innen diagnostikk av retinoblastom, en predisposisjon overfor retinoblastom og andre cancere, oppsto ved identifikasjon av fosfoprotein. Fosfoproteinet er knyttet til DNA-bindingsaktivitet beliggende i kjernen. Fosfoproteinet, identifisert som ppRB¹¹⁰, spiller en rolle ved inhibering av den onkogene aktiviteten til gener som er forskjellige fra RB-genet, og i tillegg, hemmer vekst av maligne celler.

- 5
- 10 Identifikasjon, isolering og bestemmelse av nukleotidsekvensen og kloning av RB-genet, sammen med identifikasjon av dets fosfoproteinprodukt har mange anvendelser.

- 15 En viktig primær anvendelse ligger i kapasiteten for dannelsen av RB-genproteinproduktet som deretter kan bli anvendt som et antigen for oppnå spesifikt anti-proteinantistoff. Dette antistoffet kan bli anvendt som en diagnostisk immunmarkør for undersøkelse av tilstedeværelse eller fravær av RB-genproteinet i undersøkt vev. Dersom proteinet er tilstede, er RB-genet intakt og retinoblastom ikke tilstede. Hvis proteinet derimot er fraværende eller endret, tyder dette på manglende RB-gen og resulterende retinoblastom eller andre cancere eller mottagelighet overfor disse blir diagnostisert.

20

Det er nå to tilnæringsmåter hvorved diagnostikk av retinoblastom og andre beslektede cancere kan utføres. I den første blir RB cDNA eller genomisk DNA anvendt som en probe for å bestemme om en mangel eksisterer i det kromosomale locuset til RB-genet. Alternativt er immunoscreening av vevs-biopsi med spesifikt anti-ppRB¹¹⁰.

- 25 antistoff også praktisk. Begge disse diagnostiske metodene kan anvendes for screening av familier med arvelig retinoblastom og for screening av deres barn. I tillegg kan fremgangsmåten bli anvendt for å forutsi utvikling av sekundær cancer, så som osteosarcom, fibrosarcom, glioblastom, brystkreft og andre, dersom de er knyttet til retinoblastom eller ikke.

30

Ved videre å ta i betraktning de terapeutiske fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse, kan tumorgenese bli suppressert ved å tilveiebringe klonede cancersuppresserende gener, så som RB-gener, eller cancersuppresserende genproteinprodukt, så som ppRB¹¹⁰, etter at et defekt, inaktivt eller fraværende cancersuppresserende gen er blitt diagnostisert. Disse forbindelsene kan bli tilveiebrakt gjennom molekylær induksjon eller gentransplantering av RB cDNA til individet som trenger dette. Disse fremgangsmåtene har i tillegg til deres profylaktiske verdi anvendelse i en fremgangsmåte for å

35

stoppe tumorutvikling i individer.

Ved videre å ta i betraktning utviklingen av dyremodeller, i tillegg til anvendelse av cancersuppresserende og deres beslektede proteiner, i diagnostisk, profylakse og terapeutiske anvendelser, er det mulig å anvende fremgangsmåtene beskrevet heri for å oppnå dyremodeller for studering av cancersuppresserende genfunksjon. Som et eksempel er mutante mus blitt utviklet med et inaktivt allel av RB-genet. Disse dyrene er nyttige ved videre bestemmelse av rollen og signifikansen til det cancersuppresserende genet.

På grunn av at "heterozygositet" ser ut til å være tilstanden som fører til tumorgenese, er mutante mus nyttige modeller for å teste carcinogeniteten overfor miljøforbindelser. Slike mus kan f.eks. bli utsatt for sigaretttrøyk, kunstige søtningsstoffer eller de mange forskjellige andre antatte carcinogener. Tumorutvikling i mus kan være en positiv indikasjon på carcinogeniteten til forbindelsen som blir testet. De mutante musemodellene tilveiebringer derfor et middel til å bestemme hvilke miljøforbindelser som bør unngås.

I tillegg til deres verdi som modeller for å undersøke miljøforbindelser har de mutante musemodellene også verdi i cancerterapistudier.

Det er å bemerke at hovedkonseptene diskutert heri er nyttige for isolering, kloning og anvendelse av gener som er forskjellige fra RB-genet og som har anvendelse også overfor andre cancersuppresserende gener. Nedenfor følger en mer detaljert forklaring av fremgangsmåten diskutert ovenfor sammen med detaljerte eksempler på anvendelse av RB-genet.

B. INITIELLE TRINN FOR IDENTIFISERING AV CANCERSUPPRESSERENDE GENER

For å identifisere og klonere cancersuppresserende gener er et kjent kromosom assosiert med en spesiell cancer, identifisert. Generelt kan kromosomet som bærer det defekte cancersuppresserende genet bli bestemt ved undersøkelse av fenotypisk ekspresjon i fravær av kromosomet. Slik undersøkelse kan videre bli utført etter at en del av det antatte kromosomet er blitt endret ved hjelp av kjemiske eller andre teknikker eller ved utspaltnings av deler. Generelt har forståelsen av kontroll av genetisk ekspresjon i store trekk vært basert på introduksjon av gener eller andre definerte DNA-segmenter inn i celler og vurdering av genets evne til å virke normalt.

Når et kromosom er valgt blir locuset valgt på kromosomet for det cancersuppresserende genet som skal bestemmes. Dette oppnåes for eksempel ved anvendelse av prober skutt inn tilfeldig ved antatte beliggenheter på kromosomet for å oppnå lokalisering av genet. Denne teknikken er begrenset på grunn av det store antallet gener som er knyttet til et typisk eukaryot cellekromosom.

For det andre kan det kromosomale DNAet som inneholder det antatte genet bli spaltet i fragmenter, f.eks. ved mekanisk spaltning, eller ved anvendelse av egnede restriksjons-
 10 enzymer, eller på andre måter. Denne teknikken kan bli anvendt for å etablere beliggenhet av genet ved på ny å vurdere den fenotypiske ekspresjonen av DNA-fragmentene.

For det tredje, en foretrukket fremgangsmåte for identifisering av beliggenheten til det cancersuppresserende genet er gjennom anvendelse av et markørgen. Markørgenet er
 15 fortrinnsvis beliggende i nærheten av locuset til det cancersuppresserende genet, og i tillegg er markørgenet lett å observere ved fenotypisk ekspresjon. Når markørgenet først er blitt identifisert, blir kromosomvandringsteknikker anvendt for å analysere deler av det kromosomale DNA for å lokalisere det cancersuppresserende genet. Kromosom-
 20 vandringsteknikkene anvendes for å isolere et lite DNA-segment fra en ende av en første rekombinant og dette DNA-stykket brukes som en probe for på ny å screene fagen eller kosmidbiblioteket for å oppnå en rekombinant som inneholder det DNA-stykket og "netportion" av genomet.

Den andre rekombinanten blir deretter anvendt for å oppnå en tredje, og for å tilveie-
 25 bringe et sett av overlappende klonede segmenter. Generelt kan kromosomvandringsteknikken bli anvendt bidireksjonalt langs kromosomet hvor en starter med markørgenet.

B1. IDENTIFISERING AV MARKØRGEN

30 Et eksempel på anvendelse av et markørgen er identifikasering, rensing og kloning av esterase D-genet. Kromosomvandring av esterase D-genet til kromosom 13q14:11 regionen ble oppnådd ved korrelering av tapet av esterase D-genaktivitet med kjente delesjoner på kromosom 13 hos mutante celler.

35 På grunn av at det var kjent at esterase D-genet lå i nærheten av RB-genet, ble det anvendt som et utgangspunkt for identifisering av RB-genet ved kromosomal vandring. På grunn av dets nærhet til RB-genet var esterase D-genet ideelt som et markørgen. Ikke

bare reduserte den kromosomale vandringen dets nærhet som var nødvendig for å lokalisere det cancersupprimerende genet, men også genetiske endringer av esterase D-genet som ikke bare ville resultere i en endret esterase D-gen fenotype, men også en endret cancersupprimerende genfenotype.

5

Ved utvikling av markørgenet ble aminosyresekvensen til humant esterase D-enzym identifisert og det ble også nukleotidsekvensen til esterase D cDNA. Den kromosomale beliggenheten til genet ble lokalisert og klonet esterase D cDNA ble anvendt som en genetisk markør.

10

Anvendelsen av markøren, som et utgangspunkt for kromosomal vandring og ytterligere anvendelse av esterase D cDNA som en probe, resulterte i lokalisering og kloning av retinoblastomgenet.

15

Idet det følgende oppsummeres anvendelse av humant esterase D cDNA som en genetisk markør, for en fullstendig beskrivelse av fremgangsmåten, kan det refereres til inngitte patentsøknad, ser. nr. 091,547.

20

Esteraser hører til familien av uspesifikke enzymer som katalyserer hydrolyse av estere. Human esterase D (ESD) er et medlem av esterasefamilien som kjennetegnes ved dets elektroforetiske mobilitet og relative spesifisitet for metylumbelliferylestere som substrat. Human ESD er et dimerisk enzym da det utviser flere fenotyper som et resultat av ekspresjonen av kodominante autosomale alleler, hovedsakelig allel ESD 1 og ESD 2. Den polymorfe naturen til human ESD har vært av verdi for anvendelse av human ESD som en markør i studier av populasjonsgenetikk Nature, 304:451-453 (1983); og Am. Hum. Genet., 39:1-20 (1975).

25

Aktiviteten til ESD-enzymet avhenger av den normale funksjonen til ESD-genet. Dermed vil fravær, fullstendig eller delvis eller inaktivering, delesjon av et ESD-allel, mutasjon eller andre endringer i ESD-sekvenser resultere i reduserende ESD-aktivitet. Vevene til individer med en delesjon av et kromosom 13 viser f.eks. bare 50% av ESD-aktiviteten i forhold til det som blir funnet i friske individer som har et normalt sett av to kromosomer 13, Science, 219:973-975 (1983).

30

35

Det genetiske locuset til ESD ble kartlagt til kromosom 13q14:11 regionen ved å korrelere tapet av enzymaktivitet med delesjoner av kromosom 13, Science, 208:1042-1044 (1980). Den regionale bestemmelse av ESD til 13q14:11 regionen faller sammen med

beliggenheten av retinoblastom (RB)-genet som er vist å være involvert i tumorgenese til retinoblastom, Am. J. Dis. Child., 132:161-163 (1978); Science, 219:971-973; Science, 213:1501-1503 (1981). Utvikling av homozygoti eller hemzygoti i 13q14-regionen ved delesjon, mitotisk rekombinasjon eller kromosomalt tap er blitt forstått som en hovedhendelse i retinoblastom. Dette funnet er i samsvar med hypotesen om at inaktivering av begge allelene til et gen beliggende i 13q14:11 er nødvendig for tumorgenese.

Ved undersøkning av nivåene av esterase D hørende til 13q14:11-regionen ble det tidligere hevdet at et kromosom 13 i de somatiske cellene til retinoblastom-pasienten inneholdt en submikroskopisk delesjon av RB og esterase D loci og at dette kromosomet var beholdt i tumoren, mens den normale kromosom 13 var tapt, Cancer Gen. Cytogen, 6:213-221 (1983).

Lokalisering av ESD og RB-gener i den samme kromosomale regionen utgjør en fordelaktig tilnærmelse for vurdering av RB-genfunksjonen, for oppdagelse av RB-kromosomale mønstre, for kloning av RB-genet, for isolering av RB-genet og for identifisering av RB-gensekvensen ved kromosomal vandring, ved anvendelse av ESD som utgangspunkt, Science, 235:1394-1399 (1987). Den nære koblingen mellom disse to genene muliggjør at ESD-genet virker som en viktig markør for å bestemme adferden til RB-genet, Science, 219:973-975 (1982; og Nature, 304:451-453 (1983).

Andre enn RB-genet, er det defekte genet i Wilsons sykdom blitt funnet å være beliggende i samme kromosomale region, 13q14:11, og ble dermed funnet å være koblet til ESD-genet, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:1819-1821 (1985). Wilsons sykdom, også kjent som hepatolentikulær degenerasjon, er en arvelig sykdom av ceruloplasmin-dannelse overført som en autosomal resessiv. Den er kjennetegnet ved stor reduksjon i inkorporering av kobber i ceruloplasmin som resulterer i redusert serum ceruloplasmin og kobberverdier og øket utskillelse av kobber i urinen. Den nære tilknytningen mellom Wilsons sykdomslocus og ESD-genet, som kan virke som polymorf markør for Wilsons sykdom, har store innvirkninger både på undersøkelse av primær gendefekt og for klinisk anvendelse.

Identifisert og klonet ESD cDNA tilveiebringer dermed en verdifull markør ved identifikasjon og sekvensering av både RB-genet og Wilsons sykdoms-gen vil senere føre til diagnostikk og behandling av disse sykdommene.

I inngitt US patentsøknad serie nr 091,457 er en fremgangsmåte for rensing av human ESD beskrevet ved først å isolere humant ESD fra humant vev, lysering av nevnte vev, ekstrahering av det lyserte vevet med et organisk oppløsningsmiddel, delvis rensing av ekstraktet og deretter separering av rensed ESD ved kolonnekromatografi.

5

Renset humant ESD som ble oppnådd ble deretter anvendt for preparering av spesifikke kanin anti-esteraseantistoff.

10 Antistoffet ble anvendt for å identifisere og isolere ESD cDNA-kloner ved hjelp av en teknikk for kloning av gener ved anvendelse av spesifikt antistoff som prober og for isolering av ukjente proteiner kodet av klonet DNA. Fremgangsmåten anvendte en ekspressionsvektor λ gt11 (lac5 nin5 cI857 S 100 _ som muliggjorde innskudd av fremmed DNA inn i det β -galaktosidase strukturelle genet lac Z og fremmet syntesen av hybridfusjons-proteinene DNA, 3:437-447 (1984).

15

B2. KARTLEGGING AV ESD-GENET

Kromosomkartlegging av ESD-genet til kromosom 13q14.11-regionen ble oppnådd ved å korrelere tapet av ESD-enzymaktivitet hos forskjellige mutante celler med kjente dele-
20 sjoner på kromosom 13. I tillegg understøttet analysen den konklusjonen at EL22-klo-
nen inneholdende esterase D-genet ble kartlagt til kromosom 13q14-regionen.

Ved anvendelse av esterase D cDNA som probe, ble det funnet at (i) størrelsen på este-
rase D mRNA er 1.3-1.4 kb; (ii) genet er rundt 20-35 kb, som tyder på tilstedeværelse
av store introner spredt over dette genomet; og (iii) esterase D-genet er beliggende på 30
25 kromosom 13q14-regionen. Den avledete aminosyren til esterase D-genet var unikt
sammenlignet med 4000 andre godt karakteriserte proteiner.

Ovennevnte kartleggingsdata viser at ESD-genet er beliggende på kromosom 13q14.11-
regionen uten at noen meiotisk rekombinasjon er observert med RB-genet. Disse fun-
30 nene viser at begge genene er i nærheten til tross for at den nøyaktige kilobase par-av-
standen mellom dem er ukjent. Normalt overskrider det maksimale DNA-innholdet til et
bånd, som q14:11 ikke i gjennomsnitt 1000 kb. Derimot kan avstanden mellom RB-ge-
net og ESD-genet være bare noen få kilobaser.

35 Basert på mangelen av esterase D-aktivitet i LA-RB 69 retinoblastomceller er det blitt
foreslått at en submikroskopisk delelesjon er oppstått i tumorcellene som resulterer i tap
av både RB og esterase D-gener. Det ble antatt at noe unormalt, måtte oppstå, muligens

i den regulatoriske regionen for å forårsake en vesentlig reduksjon i ekspresjonen av esterase D-genet og reduksjon av enzymaktiviteten. Det var sannsynlig at dette avviket interferer med RB-gen-ekspresjonen som fører til tumorgenese.

5 B3. KLONING AV ESTERASE D-GENET

På grunn av at det genetiske locuset involvert i genesen av retinoblastom er nært knyttet til esterase D-genet var det viktig å klonest esterase D-genet. Tilgjengeligheten av den fullstendig sekvenserte cDNA-klonen og ESD-genet lettet retinoblastom-studiene på grunn av at det muliggjorde identifikasjon av RB-genet, dets kloning og sekvensering,
10 og muliggjorde dermed en klinisk diagnostikk av retinoblastom og genetiske korrigering.

Nylig ble human esterase D rensat. Polyklonal anti-esterase D-antistoff ble dannet, og oligonukleotidprober komplementære med visse ESD-polypeptider ble konstruert. Den
15 fullstendige aminosyresekvensen til ESD-proteinet ble bestemt, og ESD cDNA ble klonet. Den fullstendige nukleotidsekvensen til både ESD cDNA og ESD-genet ble identifisert og ESD-genet ble lokalisert.

I tillegg kunne spesifikt humant anti-esterase D-antistoff binde et polypeptid med en
20 molekylvekt på omtrent 33-34 kDa, tidligere identifisert som ESD.

Ved anvendelse av dette anti-esterase D-antistoffet ble et protein korresponderende med human esterase D, immunopresipitert fra muse-, rotte-, hamster- og ape-celler.

25 Ovennevnte immunologiske reaksjon ble deretter anvendt for identifikasjon og isolering av ESD cDNA-kloner fra to λ gt11 cDNA-bibliotek. Teknikken for kloning av gener ved anvendelse av spesifikke antistoffer som prober og for isolering av ukjente proteiner kodet av klonet DNA er velkjent. Fremgangsmåten anvender generelt en ekspresjonsvektor, λ gt11 (lac5 nin5 cI857 S 100) som muliggjør innskudd av fremmed DNA inn i
30 det strukturelle genet B-galaktosidase lac Z og fremmer syntesen av hybride fusjonsproteiner, DNA, 3:437-447 (1984).

Det ble antatt at når ESD ble vist å være tilstede i mange kroppsvev, ville mRNA kodende for ESD være tilstede i vevsekstrakter og/eller i visse vevstumorert. Human hepatom og human placentatumorer har begge et relativt høyt ekspresjonsnivå av ESD
35 mRNA og var derfor spesielt egnet for deteksjon av spesifikke ESD cDNA-kloner i biblioteket. Disse to tumorene ble derfor valgt for konstruksjon av ESD cDNA-bibliotek i

λgt11-vektor.

Etter immunscreening av disse bibliotekene med anti-esterase D-antistoff ble fire kloner oppnådd. To av klonene med identiske 1.1 kb (1100 bp) innskudd, ble betegnet EL22a og EL22b. Etter analyse ble det konkludert med at EL22-klonen er esterase D cDNA.

For å bestemme størrelsen på ESD mRNA ble RNA blottinganalys utført og størrelsen på mRNA til to cellelinjer ble funnet å være $\approx 14,5S$ (1.3-1.4 kb).

En distribusjon av ESD-genet i det humane genomet ble bestemt ved Southern genomisk blottinganalys ved anvendelse av ^{32}P -merket EL22-klon. Det ble funnet at esterase D-genet var distribuert over 20-40 kb i det humane genomet. Den kombinerte størrelsen til DNA-fragmentene med positiv hybridisasjon var 20-40 kb, og dette indikerer at det er store intronsekvenser i ESD-genomet. Dette ble deretter bekreftet ved karakterisering av den fullstendige genomiske esterase D-klonen.

C. ONKOGENISITETENS GENETIKK OG KLONING AV CANCERSUPPRESSERENDE GEN

Etter identifisering og kloning av markørgenet ble dets assosierte cancersuppresserende gen identifisert og klonet. Kromosomale vandrings teknikker ble anvendt for å lokalisere det cancersuppresserende genet som skulle bli funnet. Eksemplene som er beskrevet her, vedrører anvendelse av esterase D-genet som en markør og vurdering av RB-genet i onkogenisitet. Det skal bemerkes at eksemplene beskrevet heri også vil vedrøre markørgenene og de respektive cancersuppresserende genene som brystcancersuppresserende gener, Wilms tumor-suppresserende gener, Beckwith-Wiedemann syndromsuppresserende gen, blærettransisjonell celle carcinoma suppresserende gen, neuroblastom-suppresserende gen, små cellelungecarcinom-suppresserende gen, renalcellecarcinom-suppresserende gen, akustisk neuromasuppresserende gen, kolorektalcarcinom-suppresserende gen og andre.

Kromosomvandringsteknikken utført som tidligere beskrevet, kan bli anvendt for bestemmelse av lokalisering, rensing og kloning av ovennevnte cancersuppresserende gener. Analyse av cancersuppresserende genaktivitet kan generelt bli bestemt ved observasjon av genets fenotypiske ekspresjon.

C1. RETINOBLASTOMETS GENETIKK

Som et eksempel på utførelse av foreliggende oppfinnelse er RB-genets rolle for sup-

pressering av retinoblastom bestemt.

Den genetiske kontrollen av retinoblastom og suppresjon av carcinogenitet ble vurdert ved hjelp av kloning, isolering, identifikasjon og sekvensering av retinoblastom-genet. Det klonede retinoblastomgen cDNA ble preparert og anvendt som et redskap for diagnostisering av retinoblastom, osteosarkom og fibrosarkom. Utvikling av retinoblastom-genet førte til den terapeutiske anvendelsen hvorved et defekt gen i cancerceller ble erstattet med et normalt gen for derved å undertrykke cancerdannelse.

I det følgende oppsummeres fremgangsmåten for utvikling av retinoblastomgenet, for en fullstendig beskrivelse kan det refereres til inngitte patentsøknad, serie nr. 108,748.

Det er mye som tyder på at carcinogenesis er knyttet til genetiske endringer i tumorceller. Noen av disse endringene kan oppstå i somatiske forløperceller i løpet av et individs liv, mens andre mutasjoner kan være arvet fra en foreldre-kimlinje. Sistnevnte arvetype vil forklare tilfeller av familiær cancer og arvet cancer-predisposisjon. Cancere med kjente familiære hendelser innbefatter retinoblastom, nefroblastom (Wilms tumor), neuroblastom, osteosarkom, renal cellecarcinom, melanom og brystcancer.

Flere tilnæringsmåter har blitt anvendt for å identifisere de genetiske elementer som er involvert tumorgenese. Onkogener ble opprinnelig definert i tumor-induserende retrovirus og tumor-DNA med evne for transformering av ikke-neoplastiske celler i kultur. De fleste onkogenene er aktiverte homologer av protoonkogenesis som eksisterer i normale celler.

En annen klasse av cancergener er blitt foreslått der tap av genfunksjon er knyttet til onkogenesis. Eksistensen av slike gener ble først indirekte foreslått av studier med restriksjons-fragmentlengdepolymerfimer (RFLPs) som viste et tap av spesifikke kromosomale regioner i tumor-DNA, sammenlignet med somatisk DNA fra samme pasient. "Tap av heterozygoti" er blitt observert i mange tumortyper inkludert retinoblastom, osteosarcom, Wilms tumor, hepatoblastom og rhabdomyosarkom.

Gener som gir opphav til tumorer ved tap av funksjon er blitt betegnet som "resessive onkogener" eller "cancersuppresserende gener" på grunn av at tilstedeværelsen av en eller flere normale alleler i en celle er tilstrekkelig for å forhindre ekspresjon av cancer-fenotypen.

Retinoblastom er en intraokulær cancer i tidlig barndom som oppstår fra en utviklende

- netthinne. Det er blitt rapportert at hyppigheten er omtrent 1 av 20.000 levendefødte og det er den mest vanlige intraokulære tumoren i den pediatriske aldersgruppen. To former av retinoblastom kan vises på et genetisk grunnlag. Den arvelige formen er en autosomaldominant cancernotagelighetsmarkør. Hvert avkom av en foreldre som er bærer har en 50% sjanse for å arve egenskapen og 90% av bærerne vil utvikle retinoblastom. Multiple eller bilaterale netthinnetumorer tyder på og er typiske for, arvelig retinoblastom. Bæreren har videre høy risiko for å utvikle ytterligere primære neoplasmer senere i livet, og disse typene av cancere er uvanlige typer, så som osteosarcom eller fibrosarcom, og er vanligvis fatale. Pasienter med ikke-arvelig retinoblastom har imidlertid enkelte, unilaterale netthinnetumorer og ingen øket risiko for andre typer cancere. Noen av pasientene med unilateral retinoblastom har derimot den arvelige formen. På grunn av dets klare arvelighet har retinoblastom vært en prototypisk modell for å studere genetisk sammenheng og bestemmelse i cancer.
- 15 Det er blitt hevdet at retinoblastom kan være et resultat av to mutasjonshendelser og det er videre blitt foreslått at hendelsene inaktiverer begge allelene til et enkelt gen (RB) som opprinnelig virket for å undertrykke retinoblastomdannelsen. Et individ som arver et mutant RB-allel i alle somatiske cellene vil være predisponert for å oppnå retinoblastom ved en ytterligere mutasjon av det andre RB-allelet i en forløpercelle (retinoblast). I
- 20 sporadiske tilfeller vil begge RB-allelene måtte bli inaktivert av to uavhengige somatiske mutasjoner i en enkelt retinoblast. Denne modellen vil forklare både det tidligere forløpet og multiplisiteten av tumorer i predisponerte individer. Gyldigheten av denne hypotesen må demonstreres på molekylært nivå.
- 25 Karyotyp undersøkelse av somatiske celler (fibroblaster) fra pasienter med arvelig retinoblastom beskriver en mindre undergruppe av tilfeller som inneholder synlige delesjoner på den lange armen av kromosom 13. Lignende delesjoner ble også identifisert i retinoblastom-tumorceller. Studier av en stor retinoblastom-stamtavle viser at normale individer har en balansert translokasjon som involverer 13q14, mens retinoblastom bare
- 30 hadde én 13q14-region. Bånd 13q14 var felles blant alle delesjonene og inneholdt antageligvis et gen (RB) som bestemmer mottageligheten for arvelig retinoblastom og disse delesjonene fjernet også ett allel av genet for et polymorft markørenzym, esterase D.
- 35 Det er kjent at RB-genet har en regulatorisk funksjon og at dets tilstedeværelse og normalfunksjon forhindrer utviklingen av retinoblastom. Fravær, feilfunksjon eller inaktivering av RB-genet forårsaker derimot utvikling av, eller genetisk predisposisjon og mottagelighet for retinoblastom, og antas å være hovedårsaken for både arvelig og er-

vervet retinoblastom, og for de sekundære malignitetene som ofte oppstår i retinoblastom-pasienter så som osteosarcom og fibroblastom. Det er derfor nyttig å bestemme om en genetisk predisposisjon eksisterer i et foster eller om en antar at en kan få retinoblastom senere i livet, slik at tidlig diagnostikk og mulig behandling gjennom genetisk manipulasjon kan oppnås.

C2. MOLEKYLÆR KLONING AV GENER FRA KROMOSOMREGION 13q14

På grunn av at RB-genproduktet ikke tidligere var kjent, ble kandidatgener identifisert kun på grunnlag av hensiktsmessig kromosomal beliggenhet og antatt "resessiv" adferd.

Et intakt RB-gen kunne bli uttrykt i normalt netthinnevev men ikke i retinoblastomer. "Revers genetikk" kloningsstrategier krevde en samling av en eller flere DNA-prober fra regionen av interesse. Disse kan bestå av prober for andre kjente gener eller av anonyme DNA-prober isolert tilfeldig ved et antall teknikker. Før forsøk på å klon RB-genet har flere laboratorier forsøkt å oppnå prober for region 13q14. Polymorf markørenzymesterase D ble kartlagt til 13q14 og nært knyttet til RB-genet uten kjente rekombinanter. Ved dannelse av spesifikke antisera og delvis sekvensering av proteinet, er esterase D cDNA-fragmenter blitt identifisert. Også tilgjengelig var anonyme DNA-prober kartlagt til 13q14, så som H3-8, H2-42 og 7D2 som ble isolert ved tilfeldig seleksjon fra kromosom 13-spesifikke bibliotek.

Etter identifikasjon av RB-genet ble cDNA-sekvensen og genomisk organisering bestemt. Inngitte US patentsøknad, serie nr. 098,612 beskriver aminosyresekvensen til et fosfoprotein beliggende i cellekjernen og med DNA-bindingsaktivitet.

C3. IDENTIFIKASJON AV RB-GENET VED KROMOSOM VANDRING

Esterase D-genet er blitt lokalisert, identifisert, sekvensert og klonet. Det er videre blitt lokalisert i nærheten av RB-genet. Det er derfor nyttig som utgangspunkt for identifisering av RB-genet ved kromosomal vandring. DNA-fragmenter isolert fra denne fremgangsmåten kan deretter bli anvendt som prober for å undersøke kvalitative eller kvantitative forskjeller i mRNA fra føtale netthinneceller og retinoblastom-celler. Deteksjon av slike forskjeller vil tilveiebringe bevis for at somatiske mutasjoner oppstår i RB-genet til tumorceller. DNA-fragmentene som tilsvarer defekt mRNA er de beste kandidatene for RB-genet. Tilgjengeligheten av mutante celler med kjente delesjoner i henholdsvis 13q13.114.11 og 13q14.11-q22, muliggjør videre bestemmelse av den riktige retningen for vandring mot RB-genet.

Spesifikk esterase D-klon EL22 ble sammen med en annen probe H3-8 kartlagt til

samme kromosomregion 13q14 som den kjente beliggenheten til RB-genet.

Bidireksjonal kromosomal vandring langs kromosom 13 DNA ble bestemt ved anvendelse av esterase D og H3-D som prober for å klonere ytterligere genomisk DNA og cDNA. Denne alternative screeningen førte til identifikasjon av flere bestemte kloner så som SD-1, SD-2, RB-1, RB-2 og RB-5.

RB-gener som var kandidater ble anvendt som prober i RNA-blotting for å detektere mRNA-transkripter og klonene RB-1 og RB-5 ble hybridisert med et 4.6 kb mRNA-fragment oppnådd fra normalt netthinne- og placenta-vev. Hybridisering under samme betingelser med mRNA oppnådd fra retinoblastom mRNA-transkriptene ble ikke observert.

Andre typer tumorer ikke relatert til retinoblastom, dvs. neuroblastom og meduloblastom, utviser normale 4.6 kb mRNA-transkripter.

To cDNA-bibliotek, placentale og føtale netthinner ble screenet på nytt med klon RB-1 for fullstendig cDNA-klon og resulterte i isolering av klon RB-5.

Mer enn 20 fagkloner ble i tillegg isolert fra et humant genomisk DNA-bibliotek med RB-1 og RB-5 som prober og ble deretter karakterisert ved restriksjonskartlegging og hybridisering til subfragment cDNA-prober. Et restriksjonskart av RB-genet ble deretter konstruert og viser at RB-genet består av minst 12 eksoner spredt over mer enn 100 kb DNA.

Sekvensanalyse ble utført og ga den rekonstruerte fullstendige DNA-sekvensen. Delesjonstemplater ble dannet og ga mer enn 95% av sekvensen.

Sekvensen til RB-proteinproduktene ble deretter bestemt og et aminosyrehydropatiplott ble konstruert.

Ved fremgangsmåten beskrevet i inngitte patentsøknad, serie nr. 108,748 ble et gen kodende for messenger-RNA (mRNA) på 4.6 kilobaser (kb), beliggende i nærheten av esterase D, identifisert som retinoblastom-mottagelig gen på grunnlag av kromosomal beliggenhet, homozygot delesjon og tumor-spesifikke endringer i ekspresjonen. Transkripsjon av dette genet var unormal i seks av seks retinoblastomer som ble undersøkt. I kontrast til dette var full-lengde RB mRNA tilstede i human føtal netthinne og placenta-

tumorer, og i andre tumorer så som neuroblastom og medulloblastom. DNA fra retinoblastom-cellene hadde en homozygot gendeleksjon i ett tilfelle og hemizygot delesjon i et annet tilfelle, mens det gjenværende ikke var svært forskjellig fra normalt humant kontroll-DNA.

5

RB-genet inneholder 27 eksoner distribuert i en region på over 200 kb. Sekvensanalyse av komplementære DNA-kloner ga en enkelt, lang åpen leseramme som kunne kode for et hypotetisk protein på 928 aminosyrer.

10

Et dataassistert søk på en proteinsekvensdatabase viste ingen nært beslektede proteiner. Trekk til den antatte aminosyresekvensen inkluderte potensielle metall-bindende domener som er lik de som finnes i nuklein-bindende proteiner. Disse resultatene foreslår at RB-genet er involvert som en resessiv genetisk mekanisme for regulering av humane cancere.

15

Som angitt ovenfor var det opprinnelige utgangspunktet genet som koder for esterase D som er koblet til retinoblastom-mottagelighetslocuset i bånd 13q14.11 innenfor beregnet 1500 kilobase område. Esterase D cDNA-klon EL-22 ble anvendt som en probe for å isolere dets genomiske DNA-kloner. Distale DNA-segmenter til disse genomiske klonene ble anvendt for å isolere ytterligere genomiske kloner. Ved 20 kb intervaller i vandringsregionene ble unike sekvenser identifisert som ble anvendt som prober for å isolere cDNA-kloner fra føtale netthinne- og placenta-biblioteker. En lignende strategi som anvender H3-8 som prober ble utført for å isolere kandidatgenene. En kromosomvandring i begge retninger som dekker hundrevis av kb er blitt bestemt ved alternerende screening av genomiske og cDNA-bibliotek.

25

RB-genkandidater ble anvendt som prober i RNA-blottinganalysr for å detektere relevante messenger RNA (mRNA) transkripter, polyadenylert RNA ble preparert fra humane føtale netthinner (oppnådd ved disseksjon av omtrent 25 første- eller andre-

30

"transfer" føtale øyne) og fra deler av normale humane placentaer. På grunn av at de primære retinoblastom-tumorprøvene som er store nok for å tilveiebringe tilstrekkelig mRNA for analyse ikke vanligvis er tilgjengelig, blir preadenylert RNA isolert fra dyrkede celler fra seks retinoblastomer. I tillegg ble polyadenylert RNA isolert fra tre neuroblastomer og en medulloblastom og fra en primær medulloblastom-prøve.

35

Esterase D-transkripter (1.4kb) ble detektert i alle tumor- og vevsprøver. Dette funnet var i samsvar med kjent "konstitutiv" ekspresjon av esterase D. Esterase D hybridisa-

sjon ble deretter anvendt som en positiv kontroll.

5 Kun store delesjoner og ingen små del-delesjoner av RB-genet, ble sett i disse tumorene, deteksjon av et intakt genom impliserte ikke normal genekspressjon. Slike forskjeller kan være forårsaket av mutasjoner i promoterregionen. Forklaringer for redusert mRNA-transkriptstørrelse innbefatter små delesjoner innenfor eksoner (som ikke behøver å endre gel-mobiliteten til store ekson-spleisesekvenser eller andre mRNA-prosesserings signaler tilstrekkelig.

10 De mange store Hind III-båndene som sees ved DNA-blottinganalys, foreslår at RB-locuset var spredd over en stor genomisk region. For å klargjøre den genomiske strukturen ble ytterligere mer enn 20 fagkloner isolert fra det humane genomiske DNA-biblioteket med RB-1 og RB-5 som prober. Disse klonene ble karakterisert ved restriksjonskartlegging og hybridisering til subfragment cDNA-prober. I sammenheng med
15 data fra genomisk DNA-blotting ble Hind III-restriksjonskart av RB-genet konstruert. RB-genet består av 27 eksoner spredt over mer enn 200 kb DNA. Et stort intron på minst 50 kb er beliggende mellom eksoner fra RB-1/RB-5 overlappende region.

En cDNA-klon med egenskaper som kom fra RB-genet er nylig beskrevet i Nature,
20 323:643-646 (1986). Denne klonen detekterte et 4.7-kb mRNA transkript tilstede i adenovirus 12-transformerte netthinne celler, transkriptet var fraværende i fire av fire retinoblastom-cellelinjer. Delesjoner som innbefatter en del av eller hele dette genet, ble observert i fem retinoblastomer, men ingen av disse var indre homozygote delesjoner. Disse funnene var ikke tilstrekkelig for nøyaktig å identifisere RB-genet. Sekvensdata
25 var ikke innbefattet i rapporten og restriksjonskartet til cDNA-klonen var lik de som ble funnet i denne oppfinnelsen.

Som angitt ovenfor var RB-genekspressjonen, som spesifikt var endret i retinoblastom, ikke begrenset til normal føtal netthinne, men ble også sett i minst ett annet normalt
30 ubeslektet vev, nemlig placenta. For en mer omfattende undersøkelse ble mRNA fra føtalt og voksent rottevev preparert og analysert ved RNA-blotting. Et 4.6-kb mRNA transkript (sannsynligvis normalstørrelse for rotte) detektert i alle vev til tross for at mengden varierte betraktelig. En annen art av transkript, omtrent 2.3 kb i størrelse, var tydelig i føtal rottehjerne. Dette korte transkriptet kan representere enten forskjellig pro-
35 sesserings av RB-genet eller transkripsjon av et separat, men nært beslektet gen.

Nylig ble en annen RB cDNA-klon isolert som inneholdt et ytterligere 234 basepar på

5'-enden. Den reviderte RB cDNA-sekvensen hadde et ytterligere metioninkodon ved nukleotid 139. Når dette metioninet ble anvendt som initieringskodon hadde det antatte RB-proteinet 928 aminosyrer og en molekylvekt på 110 kb. Det andre metioninet i lese-ramme var i base 346. På grunn av at nukleotidsekvensen ved første ATG ikke er typisk for andre kjente mRNA, bør startkodontildelingen bli ansett som tentativ. Senere favoriserte in vitro translasjons-resultatene første metionin som autentisk initieringssete. Et datasøk til National Biological Research Foundation proteinsekvens-database sekvens detekterte ingen sterk homologi med noen av mere enn 4000 publiserte aminosyresekvenser. Et antall nukleinsyrebindende proteiner og virale proteiner viste svak sekvens-homologi med en gjær-DNA-rettet RNA-polymerase som har høyest homologiscoring.

Den antatte proteinsekvensen inkluderte ti potensielle glykosyleringsseter, men et kandidattransmembrandomene (minst 20 påfølgende hydrofobe residier) ble ikke funnet. Aminosyrehydropati-plott viste en svak hydrofob region nær den antatte aminotermi-
 15 og en hydrofil region ved den karboksyl-terminale enden. To par korte aminosyresekvenser som var omgitt av cystein og histidin-residier på samme måte som metallbindende domener som finnes i nukleinsyrebindende proteiner, ble identifisert. En region av 54 aminosyrer fra posisjon 663 til 716 inneholder 14 prolinresidier (26%). Slike prolin-rike regioner er også blitt observert i de nukleære onkogen-proteinene myc og myb. Idet disse observasjonene ikke er signifikante, blir det foreslått at RB-genproduktet kan være et nukleinsyre-bindende protein. RB-protein ppRB¹¹⁰ er blitt funnet å være hovedsakelig beliggende i cellekjernen. Retinoblastom-genet er tidligere blitt funnet å være av resessiv natur. Tumor-spesifikke endringer i genekspresjon tilveiebringer det beste beviset for identifisering av dette genet som RB, og eksemplene på homozygot
 20 delesjon og fravær av mRNA-ekspresjon understøtter dets postulerte resessive natur.

Pasienter som har arvelig retinoblastom, har en høy grad av osteosarcom som andre primærcancer. Inaktivering av retinoblastom-mottagelighet (RB)-genet er implisert i genesen av osteosarcom ved kromosomal homozygoti i 13q14-regionen funnet i flere
 30 osteosarcompasienter med eller uten retinoblastom-historie.

I lys av det ovennevnte er det klart at rollen til RB-genet i tumordannelsen er av mer generell interesse enn det som gjelder for en sjelden barnecancer. Resessive gener som er lik RB kan for det første kontrollere andre uvanlige embryonale barne-cancerformer så
 35 som nefroblastom (Wilms tumor), hepatoblastom, embryonal rhabdomyosarcom, og neuroblastom. Som retinoblastom ligner alle disse tumorene massiv utvekst av vev funnet i normal embryogenese. Nefroblastom er blitt assosiert med delesjoner i kromosom-

region 11p13 og ved sidenavliggende polymorfe markører blir homozygote i disse tumorene.

C4. RB-GENET I ANDRE CANCERE

- 5 På grunn av at sekvensen til RB-genet nå er kjent kan rollen til RB-genet i andre tumorer nå utforskes. Retinoblastom-pasienter har en høy grad av andre maligniteter som oppstår på forskjellige steder. Osteosarcom er den mest vanlige. Reduksjon til homozygoti i region 13q14 er blitt rapportert i osteosarcomer selv uten retinoblastom, dette indikerer en felles onkogen mekanisme for de to tumorene til tross for deres histologiske og onkologiske ulikheter. I kontrast til dette, involverer neuroblastom og medulloblastom, som er betraktet som nært beslektet med retinoblastom, tilsynelatende ikke endringer av RB. Ytterligere studie av RB-genet vil sannsynligvis tilveiebringe innsikt i enhetlige mekanismer for onkogenesen.
- 10
- 15 Med analogi til retinoblastom, er en klasse "cancersuppresserende gener" blitt postulert å forklare andre typer av arvelige cancerformer, og tumor-spesifikke kromosomale delelsjoner. Retinoblastomer og osteosarcomer oppsto ofte i samme pasienter, og flere osteosarcomer (fra pasienter både med og uten retinoblastom-historie) demonstrerte et tap av heterozygositet i kromosom 13-markører. Noen få brystcancer viste også spesifikt tap av kromosom 13 heterozygositet. Tap av heterozygositet er blitt funnet i kromosom 11p i Wilm's tumor (i samsvar med kjente delelsjoner), tumorer fra Beckwith-Wiedmann-syndrom, transisjonale cellegliomer fra blære og igjen brystcancer. Andre suppresserende loci er likeledes involvert i i neuroblastom, små celle lungecarcinoma, renalcelleglioma, akustisk neurom, og colorektale carcinomer.
- 20
- 25 RB-genet ble opprinnelig identifisert på grunnlag av endret RB-geneekspresjon i retinoblastomtumor sammenlignet med normale vev. Mange ytterligere tumorer og neoplastiske cellerlinjer er blitt undersøkt, og flere med enten DNA-rearrangeringer, endret RB mRNA eller fravær av RB-protein er blitt funnet. Av åtte osteosarcom-cellerlinjer som ble testet, utviste f.eks. tre (G292, SAOS2 og OHS) uregelmessigheter på proteinnivå. G292 uttrykte RB-protein med øket molekylvekt, mens SAOS2 og OHS manglet fullstendig RB-protein. Begge osteosarcom-cellerlinjene uten RB-protein hadde forkortede RB mRNA-transkripter, og G292 hadde både forkortet og RB mRNA-transkripter med normal størrelse. Cellerlinje SAOS2 hadde heterozygot delelsjon i 3'-enden av RB-genet, som involverer ekson-inneholdende Hind III-fragmenter av eksoner i et indre 7.5 Hind III-fragment. G292 hadde derimot en omtrent normal RB-genstruktur.
- 30
- 35

- RB-protein var også fraværende fra en synovial sarcom-cellelinje (GHM) der RB mRNA med normal størrelse var tilstede. GHM DNA var også omtrent normal ved DNA-blottinganalyse med RB cDNA-prober. Denne cellelinjen utgjør det første kjente eksempelet på RB-geninaktivering som tilsynelatende bare er på proteinnivå. En frisk
- 5 prøve fra en synovial sarcom-tumor, SDSY1, ble også analysert. Både normal-størrelse og forlengede RB mRNA transkripter (6.5 kb) ble observert ved RNA-blotting og ser ut som om transkripter med normal størrelse kan bli avledet fra ikke-neoplastiske celler innblandet i hele tumorer. Analyse av SDSY1 DNA med RB cDNA-prober viste ekstra restriksjonsfragmenter i tillegg til alle de normale fragmentene etter spaltning med
- 10 HindIII, EcoR I og Pst I endonukleaser som indikerer indre RB-genduplisering. Duplisering av eksoner i disse fragmentene kan tilføye omtrent 1.1 kb til RB mRNA transkriptet, og vil vesentlig svare for den observerte mRNA-størrelsen (6.5 kb). Andre studier har bekreftet tilstedeværelsen av RB-genmutasjoner i friske osteosarcomer og forskjellige bløt-vevssarcomer fra pasienter uten en retinoblastom forhistorie.
- 15
- RB-geninaktivering i to av de ni humane brystcancer-cellelinjene ble nylig funnet. RB-genet til den ene cellelinjen hadde en homozygot indre duplikasjon på 5 kilobase (kb) region inneholdende eksonene 5 og 6. RB mRNA transkriptet var tilsvarende forlenget, og det ble sagt at translasjonen ble terminert for tidlig forårsaket av et skift i leserammen. Den andre cellelinjen hadde en homozygot delesjon i RB-genet som fjernet hele
- 20 genet utover ekson 2. RB-genproduktet, pp130^{RB}, var ikke detekterbar i noen av cellelinjene ved immunopresipitasjon med et spesifikt antistoff. Det ble også nylig rapportert tap av RB-genespresjon i noen cellelinjer avledet fra småcellet carcinomer i lunge.
- 25
- Disse resultatene understøtter en rolle for RB-genmutasjon i genesen av cancere forskjellig fra retinoblastom. For hver tumortype er derimot mutasjoner blitt detektert i bare en del av tilfellene. Det er to mulige forklaringer: 1) det er genetisk heterogenitet blant disse tumorene, slik at bare en fraksjon av hver tumortype involverer RB-genet; og/eller 2) noen inaktiverende mutasjoner av RB-genet er ikke blitt detektert.
- 30

C5. KLONING AV RB-GENET

Identifikasjon, isolering, bestemmelse av nøyaktig nukleotidsekvens og kloning av RB-genet har mange anvendelser.

- 35 Den primære anvendelsen ligger i sekvenstranskripsjonen inn i tilsvarende mRNA som igjen blir translatert i RB-genprotein-produkt. Proteinproduktet kan deretter bli anvendt som et antigen for å oppnå det spesifikke anti-RB protein-antistoffet. Antistoffet blir

5

10

15

C6. ONKOGENISITET AV MUTANTE RB-GENER

20

25

[illegible]

En-bokstav forkortelser for aminosyresidene er: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Gly; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp og Y, Tyr.

5

Aminosyresekvensen (tabell 1) er skrevet i den forkortede koden som er kjent innenfor fagområdet. En-bokstav forkortelser for aminosyresidene er : A = Alanin, C = Cystein, D = Asparaginsyre, E = Glutaminsyre, F = fenylalanin, G = Glycin, H = Histidin, I = Isoleucin, K = lysin, L = Leucin, M = Metionin, N = Asparagin, P = Prolin,
10 Q = Glutamin, R = Arginin, S = Serin, T = Treonin, V = Valin, W = Tryptofan og Y = Tyrosin.

RB cDNA sekvens, Science, 235:1394-1399 (1987) inneholdt en lang, åpen leseramme fra nukleotid 1 til og med 2688, som når translatert fra det første metioninkodonet, ga et
15 hypotetisk protein på 816 aminosyrer og molekylvekt 98 kD. Nylig inneholdt en annen isolert RB cDNA-klon ytterligere 234 basepar ved 5'-enden. Den reviderte RB cDNA-sekvensen opprettholdt ennå den samme åpne leserammen som i de opprinnelige klonene, og et ytterligere metioninkodon ble funnet ved nukleotid 139. Når dette kodonet ble anvendt som et initieringskodon hadde det antatte RB-proteinet 928 aminosyrer og
20 en molekylvekt på 110 kD - som er identisk med den tilsynelatende molekylvekt bestemt ved SDS-PAGE. Den ytterligere 5'-sekvensen inneholder en GC-rik region som translateres til en uvanlig gruppe av alanin og prolinresidier.

Uoverensstemmelser mellom de virkelige og tilsynelatende molekylvektene på SDS-
25 PAGE kan bli forklart ved sekundære proteinmodifikasjoner. Flere potensielt N-koblede glykosyleringsseter er tilstede i den antatte aminosyresekvensen. Når derimot LAN-cellene blir dyrket i medium supplert med ^{14}C -galaktose eller ^3H -glukosamin ble merket RB-protein ikke detektert til tross for forlenget autoradiografi. I tillegg, spaltning av ^{35}S -merket RB-protein av endoglycosidase H ifølge fremgangsmåten beskrevet i J.
30 Bill. Chem., 250:8569-8579 (1975), resulterte ikke i en reduksjon av tilsynelatende molekylvekt.

Når neuroblastomcellene LAN-1 ble metabolsk merket med ^{32}P -fosforsyre og immunopresipitert ga det immunopresipiterte proteinet et enkelt bånd med molekylvekt som er
35 identisk med ^{35}S -merket RB-protein. Resultatene viser kolonnene 2 + 3 som viser et ^{35}S -merket bånd ved 110-114 kD og kolonne 5 - ^{32}P -merket bånd ved 110-114 kD. Kolonnene 1 (^{35}S) og 4 (^{32}P) blir immunopresipitert med preimmun kanin IgG. Når

aliquotene av RB-prøvene merket med ^{35}S -metionin ble spaltet over natt med endoglycosidase H, har det ingen detekterbar reduksjon på molekylvekten 110-114 kD. Ovennevnte funn understøtter antagelsen om at retinoblastom-genet er et fosfoprotein på molekylvekt 110-114 kD. Fosfoproteinet ble derfor angitt som ppRB¹¹⁰.

5

D. DIAGNOSTISKE PROSEDYRER SOM ANVENDER CANCERSUPPRESSERENDE GENPRODUKTER

Etter lokalisering og kloning av et ønsket cancersuppresserende gen, kan det klonede genet bli anvendt for å oppnå et genprodukt som er nyttig for diagnostisering av cancer
10 relatert til det cancersuppresserende genet.

Teknikken innbefatter først utvikling av et produkt som kan reagere med det cancersuppresserende genproduktet til en pasients vevsprøve. I dette henseendet blir reaksjonen mellom produktet observert for å bestemme tilstedeværelse eller fravær av den normale
15 fenotypiske ekspresjonen av det cancersuppresserende genet til vevsprøven.

Ved anvendelse av det klonede cancersuppresserende genet kan et antistoff bli utviklet. Antistoffet som er spesifikt for det cancersuppresserende genproteinproduktet blir anvendt for å reagere med det cancersuppresserende genproteinproduktet i en pasients
20 vevsprøve for å bestemme om det cancersuppresserende genet virker på riktig måte. I et vanlig tilfelle blir riktig cancersuppresserende genfunksjon demonstrert for et immunkompleks mellom antistoffet og det cancersuppresserende genproteinproduktet blir dannet. Svikt i immunkompleks tyder på defekt, unormal eller fraværende cancersuppresserende genproteinprodukt. Det at antistoffet ikke danner et immunkompleks med pasientens vevsprøvesubstrat tyder på et defekt eller fraværende cancersuppresserende gen i
25 pasienten.

Det spesifikke antistoffet blir generelt produsert ved anvendelse av det normale cancersuppresserende genproteinproduktet som et antigen ifølge kjente teknikker. Andre konvensjonelle teknikker kan også bli anvendt for å danne de ønskede antistoffene.
30

Som et spesifikt eksempel på teknikken beskrevet heri, er proteinproduktet til RB-genet blitt identifisert. Ifølge fremgangsmåten beskrevet i inngitte US-patentsøknad serie nr. 098,612 ble immunopresipitering av fosfoproteinet oppnådd ved anvendelse av preimmunt kanin-antisera og, som beskrevet i nevnte søknad, ble et protein med molekylvekt
35 110-114 kD immunopresipitert med anti-ppRB¹¹⁰ IgG.

D1. DIAGNOSTISKE PROSEDYRER FOR BESTEMMELSE AV CANCER PREDISPOSISJON

Når det cancersuppresserende genet er identifisert og klonet er klonen nyttig diagnostisk. I dette henseendet kan pasientene bli screenet for deres predisposisjon overfor cancer ved å observere den fenotypiske ekspresjonen av det cancersuppresserende genet i en vevsprøve som er tatt fra en pasient.

D2. IDENTIFIKASJON OG FUNKSJON AV RB-PROTEINET

Som et spesifikt eksempel relativt til retinoblastom cancersuppresserende gen er fosforproteinproduktet til retinoblastom-mottagelighetsgenet blitt lokalisert primært i cellekjernen som har DNA-bindende aktivitet. Dets aminosyresekvens er blitt identifisert. Fosfoproteinet, identifisert som ppRB¹¹⁰ blir anvendt for diagnostisering av retinoblastom og andre cancerformer som involverer retinoblastom-genet, og i en viss grad for behandling av disse cancerne og for vurdering av onkogenisiteten til andre gener.

Identifiseringen av ppRB¹¹⁰ er oppsummert heri, men for en fullstendig beskrivelse kan det refereres til inngitte patentsøknad serie nr. 098,612.

Som angitt i inngitte US patentsøknad, serie nr. 098,612 tyder de eksperimentelle bevis på at fullstendig inaktivering av RB-genet er nødvendig for tumordannelse, og at en ny funksjonsmåte eksisterer for RB-genet som en undertrykking av cancerfenotype.

På grunn av at genvirkningen generelt er mellomliggende for proteinproduktet ser det ut som om RB-genproteinproduktet vil ha en gen-regulatorisk aktivitet.

Oppnåelse av fullstendig aminosyresekvens til RB-genproteinproduktet, spesifikt anti-retinoblastom proteinantistoff, dets biokjemiske karakterisering, subcellulære lokalisering og DNA-bindingsaktivitet er av viktighet for videre bestemmelse av RB-genregulatorisk og onkogen aktivitet.

Aminosyresekvensen til et protein kan bestemmes av den genetiske koden til det bestemte genet som er ansvarlig for dette bestemte proteinet. For å isolere proteinet, bestemme dets nøyaktige aminosyresekvens og å bestemme dets fysiologiske funksjon i kroppen, er det nødvendig å isolere og lokalisere det ansvarlige genet, og klonе det og å sekvensere cDNA som er nyttig for identifikasjon av genets spesifikke proteinprodukt.

Ved anvendelse av fremgangsmåten for kromosomal vandring fra andre kromosom 13-

markører, ble retinoblastomgenet og koden for aminosyresekvensen identifisert ved kromosom13, 13q14:11-regionen. Ved anvendelse av esterase D cDNA-kloner og ved screening av genomiske og cDNA-overlappende kloner ble henholdsvis RB-1 og RB-2 på 1.6 kb identifisert i humane cDNA-bibliotek. Senere ble en annen klon RB-5 også

5 identifisert.

Først ble RB-1-klonen hybridisert med 4.8 kb mRNA-transkriptet i human føtal netthinne og placenta. I retinoblastomprøvene detekterte RB-klonen enten et unormalt mRNA-transkript eller at mRNA-transkriptene ikke ble observert i det hele tatt. Deretter

10 ble RB-5-klonen identifisert, med et 3.5 kb innskudd, dette ga identiske resultater som RB-1 i mRNA-hybridisering. Restriksjonsenzymanalyse foreslo at RB-5 og RB-1-klonene overlappet i en 0.4 kb region og begge definerte sammen et DNA-segment på omtrent 4.6 kb, en størrelse som er nær opp til det normale RB mRNA-transkriptet.

15 Nukleotidsekvensanalyse av klonene RB-1 og RB-5 ble utført ved dideoksyterminator-metoden beskrevet i Proc. Natl. Acad. Sci., 74:5463-5467 (1977) og ga den rekonstruerte fullstendige cDNA-sekvensen. Forskjellige delesjonstemplater ble dannet ved "syklon"-metoden i enkelttrådede M13-fag kloner som ga mer enn 95% av sekvensen. De gjenværende gapene ble sekvensert ved primer-ekstensjon i begge tråder. Den fullstendige sekvensen identifisert på denne måten, inneholdt 4,523 nukleotider.

Ytterligere analyser understøttet antagelsen om at RB-genproduktet var et nukleinsyrebindende protein. I tillegg demonstrerte nukleotidsekvensanalyse av RB cDNA-klonene en lang-åpen leseramme kodende for et hypotetisk protein med trekk som tyder på en

25 DNA-bindende funksjon. Det ble identifisert og anvendt som et antigen for oppnåelse av spesifikt antistoff og for å bestemme dets antatte DNA-binding.

Etter preparering av spesifikk kanin-polyklonalt antistoff mot RB-protein ble det rensede anti-RB IgG-antistoffet anvendt for immunopresipitering, immunofarging og lokalisering av RB-proteinet. Det ble antatt at antistoffet vil være nyttig for diagnostisk

30 identifikasjon av RB-proteinet i humane vevsprøver.

For å identifisere RB-proteinet ble flere humane cellelinjer kjent for å ha enten normal eller endret RB-ekspresjon, selektert.

35

LAN-1 neuroblastom-cellelinje, normale humane fibroblaster, humane hepatoma Alexander cellelinje og osteosarcom U2OS-cellelinjen ble anvendt som positive kontrol-

ler inneholdende normalt RB mRNA. Alle disse cellene ble ervervet fra American Type Culture Collection (ATCC), Inc. deponeringsinstitusjon. Cellelinjer med forventet forkortet eller fraværende RB mRNA, så som retinoblastom-cellelinjene Y79 (ATCC), RB355 (gave fra Robert Philips, Toronto, Canada), WERI-1, WERI-24 og WERI-27
 5 (gave fra T.Sery Wills' eye hospital, Philadelphia) ble anvendt som negative kontroller.

Alle normale humane cellelinjer som beskrevet ovenfor og alle celler fra fem retinoblastomer ble merket med ^{35}S -metionin og immunopresipitert med preimmun kanin-antistoff IgG eller kanin anti-RB IgG.

10

Celler fra alle humane cellelinjer ble metabolsk merket med ^{35}S -metionin ifølge fremgangsmåten beskrevet i J. Virol, 38:1064-1076 (1981). Merkede celleblandinger ble immunopresipitert med 1-20 μl , fortrinnsvis 10 μl , på fra 50 $\mu\text{g/ml}$ - 200 $\mu\text{g/ml}$, fortrinnsvis 100 $\mu\text{g/ml}$ anti-RB antistoff IgG ved anvendelse av prosedyren beskrevet i
 15 J. Virol, 38:1064-1076 (1981).

I alle kontrollcellelinjene ble en proteindublett med tilsynelatende molekylvekt på 110-114 kD detektert. I retinoblastom-cellelinjene, eller i celler immunopresipitert med pre-immunt serum ble proteindubletten ikke detektert.

20

RB-proteinene immunopresipitert med kanin anti-RB IgG ble analysert ved SDS/polyakrylamid-gelelektroforese og autoradiografert. Resultatene indikerte immunopresipitasjon av normale positive, dvs. RB-protein-inneholdende cellelinje merket med ^{35}S -metionin.

25

D3. LOKALISERING OG FUNKSJON AV ppRB¹¹⁰

Cellene fra flere vertebrat-arter, så som QT6 (vaktel), NIH/3T3 (mus), Rat-2 (Rotte) og cos (ape) ble merket med ^{32}P -fosforsyre og proteinene ble immunopresipitert med anti-RB IgG. Antigenisk beslektede proteiner ble detektert i alle cellene med tilsynelatende
 30 like molekylvekter på 108 kD i vaktel, 120 kD i mus, 128 kD i rotte og 108-110 kD i ape, sammenlignet med 110-114 kD i humane celler.

Den antatte hele aminosyresekvensen til ppRB¹¹⁰-proteinet har flere karaktertrekk som ligner de som er tilstede i andre onkogener. Den subcellulære lokaliseringen av
 35 ppRB¹¹⁰ ble undersøkt ved cellulær fraksjonering for å identifisere distribusjonen av ppRB¹¹⁰ blant nukleære, cytoplasmiske eller cellemembran-fraksjoner. Det ble bestemt at 85% ppRB¹¹⁰ ble funnet i kjernefraksjonen, mens en liten mengde ppRB¹¹⁰ var lo-

kalisert i cellemembranen. Det var ingen detekterbar tilstedeværelse i den cytoplasmiske fraksjonen.

5 For videre å bevise at ppRB¹¹⁰ er lokalisert primært i kjernen ble osteosarcom-cellelinj-
ene U2OS kjent for å ha en fordelaktig cellemorfologi for immunhistokjemisk farging,
anvendt. Som en eksperimentell gruppe ble U2OS-cellene immunopresipitert med anti-
ppRB¹¹⁰ IgG. Som en kontrollgruppe ble U2OS-cellene immunopresipitert med preim-
mun IgG. Begge gruppene ble deretter inkubert med rhodamin-konjugert geite-antikanin
10 IgG kjøpt fra Sigma. Immunofluorescens ble observert i celler omsatt med anti-
ppRB¹¹⁰ IgG, dvs. cellekjernen. Cellene omsatt med preimmun kontroll viste ingen
fluorescens.

15 Subcellulær lokalisering av ppRB¹¹⁰ i den nukleære fraksjonen tyder på at RB-prote-
inet spiller en viktig regulatorisk rolle i regulering av andre gener og har en DNA-bin-
dende aktivitet.

Visse cellelinjer, spesielt de fra tumorer forskjellig fra retinoblastom, så som neuroblas-
tom LAN-1-cellene ble radioaktivt merket med ³²P-fosforsyre. Cellulære lysater av
disse merkede celleblandingene ble separert ved enkelt- eller dobbelttrådet kalvetymus
20 DNA-cellulosekolonner ifølge fremgangsmåten beskrevet i Mol.Cell.Biol., 6:4450-4457
(1986).

De oppnådde resultatene foreslår at ppRB¹¹⁰ bare bindes til et begrenset antall DNA-
seter som lett kan bli mettet. Det er tidligere blitt vist at andre proto-onkogener så som
25 c-myc, n-myc, c-myb og c-fos er nukleære fosfoproteiner med DNA-bindende aktivitet
Mol. Cell. Bill., 6:4450-4457 (1986), Nature, 296:262-266 (1982). Onkogen aktivering
av disse proto-onkogenene oppstår ved deregulering av genekspresjonen eller ved struk-
turell modifikasjon, og genproduktet er vesentlig for onkogenisitet.

30 Selv om radioimmun-analyseteknikker ble anvendt er det å bemerke at fremgangsmåter
så som enzymimmunoanalyse (Western blot-analyse), immunocytochemisk analyse, og
andre, også kan anvendes.

D4. REGULATORISK FUNKSJON AV ppRB¹⁰

35 Det er fravær av ppRB¹¹⁰ og ikke nærværet som ser ut til å være onkogen på grunn av
delvis eller fullstendig inaktivering av RB-genet. Tilstedeværelse av ppRB¹¹⁰ hemmer
derfor den onkogene aktiviteten til andre gener noe og gjør benign cellevekst mulig.

ppRB¹¹⁰ er dermed et viktig regulatorisk protein som kan bli forhindret og inhibert, ved dets tilstedeværelse, og ved dets fravær, utløse malign vekst. ppRB¹¹⁰ er viktig forhold til regulering av andre gener. Fravær eller tap av ppRB¹¹⁰ formidler onkogenitet.

5 D5. ppRB¹¹⁰ SOM ET DIAGNOSTISK REDSKAP

Rollen til ppRB¹¹⁰ som en mediator for onkogenitet fører til flere praktiske anvendelser.

10 Tilstedeværelse eller fravær av ppRB¹¹⁰ virker som et diagnostisk redskap for bestemmelse av tilstedeværelse eller predisposisjon for retinoblastom og andre RB-gener involverer tumorer hos dyreføtus eller embryo. Tidlig diagnostikk muliggjør dermed et tidlig varsel og behandling av retinoblastom og andre tumorer med muligheten for å forhindre utvikling av sekundær tumorgenese.

15 Anvendelse av ppRB¹¹⁰ for å diagnostisere tilstedeværelse eller predisposisjon for retinoblastom er gjennom immunoscreening av vevsbiopsien ved spesifikt anti-ppRB¹¹⁰-antistoff. Vevsbiopsien blir enten radioaktivt merket og immun-screenet eller proteinene ekstrahert fra vevbiopsien og blottet på nitrocellulosefiltre og probet med merket antistoff ifølge fremgangsmåtene kjent innenfor fagområdet som Western blotting.

20 Det antas at slike lett tilgjengelige diagnostiske metoder vil bli anvendt spesielt for screening av familier med arvelig retinoblastom forhistorier. Videre er den diagnostiske metoden også nyttig for å forutsi utviklingen sekundær cancer, så som f.eks. osteosarcom, fibrosarcom, glioblastom, brystcancer enten de er koblet til retinoblastom eller ikke.

25 En annen anvendelse er tumorgenese-suppresjon hvor fraværende ppRB¹¹⁰ vil bli tilveiebrakt gjennom molekylær induksjon og gentransplantering av RB cDNA til individet som trenger ppRB¹¹⁰.

30 En ytterligere anvendelse er suppresjon av cancertvekst ved å tilveiebringe det intakte RB-genet direkte til tumorcellene. Cellene produserer deretter ppRB¹¹⁰ som deretter påvirker de andre tumorcellene.

35

E.GENTERAPI OG PROFYLAKSE

Som tidligere beskrevet er diagnostiske teknikker ifølge denne oppfinnelsen, nyttige for

å bestemme individets mottagelighet overfor cancer. For å tilveiebringe terapi og/eller profylakse blir det klonede cancersuppresserende genet levert til organismen for å kontrollere suppresjonen av cancer. Levering av det klonede genet blir oppnådd ved konvensjonelle vektorer, og i noen applikasjoner er det klonede genet hensiktsmessig for topisk applikasjon.

Foretrukne leveringsteknikker inkluderer anvendelse av viruses liposimes, og andre vektorer. Levering av klonede cancersuppresserende gener, ved hjelp av egnede vektorer, har profylaktiske og/eller terapeutiske virkninger på pasienter som har et defekt eller fraværende cancersuppresserende gen, mens ingen negative bivirkninger vil bli dannet av et individ som er genetisk normalt. Når en profylaktisk situasjon angis, så som når en predisposisjon for cancer er blitt bestemt for eksempel ved undersøkende diagnostikk, blir klonede cancersuppresserende gener gitt til pasienten. Som angitt ovenfor er det ikke ventet at administreringen av slike klonede gener vil påvirke individet med normal genetisk utrustning på negativ måte.

Som et eksempel ble RB-genet testet terapeutisk og profylaktisk. Med den hypotetiske cancersuppresserende aktiviteten til RB-genet, ble et analysesystem for RB-genfunksjon utviklet ved å innføre genet i dyrkede tumorceller inneholdende inaktiverte endogene RB-gener. Det å ikke finne en effekt i denne enkle analysen vil ikke nødvendigvis uriktiggjøre antagelsen om genetisk suppresjon av cancer. Et positivt resultat (suppresjon av den neoplastiske fenotypen) vil derimot forsterke dette konseptet.

Direkte deteksjon av RB-genmutasjoner vil av følgende grunner ha klinisk anvendelse:

- 1) sporadiske unilaterale arvelige og ikke-arvelige tilfeller kan skjelnes fra hverandre ved å undersøke pasientens fibroblaster, noe som muliggjør nøyaktig vurdering av risiko for sekundære primære cancere og for overføring til avkom; 2) genetisk diagnostikk vil være mulig uten informative RFLP eller undersøkelse av andre familiemedlemmer. Som beskrevet ovenfor kan intron 1-proben være nyttig for dette, avhengig av hvilken fraksjon av de mutante RB-genene som har rearrangementer i denne regionen. Andre vanlige mutasjonssteder i RB-genet kan bli identifisert, og prober kan bli konstruert spesifikt for deteksjon derav. Det er mulig at RB-genpromoterens kan være et slikt vanlig sete.

Antistoffer mot RB-proteinet kan ha diagnostisk og/eller prognostisk anvendelse i klinisk medisin. Mutasjoner i RB-genet kan bli vist for eksempel ved fravær av immunoperoxidasefarging av tumordeler, idet ikke-neoplastisk stroma tilveiebringer en indre

positiv kontroll. RB-antistoffer kan anvendes for å løse uklarheter i vevsdiagnostikk av ben eller bløt-vevsneoplasier. Kanskje kan bryst-cancer klassifiseres i underklasser på grunnlag av RB-geninvolvering.

- 5 Dersom inaktivering av RB-benet er hovedårsaken til retinoblastom og andre cancere, så er opprettelse av normal RB-gen aktivitet ved genoverføring en ny tilnærmedes måte for senere cancerterapi. For å teste RB-genfunksjonen på cellulært nivå ble et analysesystem som anvender RB- og lux-virus utviklet for å innføre genet i dyrkede tumorceller inneholdende inaktiverte endogene RB-gener.

10

E1.PRODUKSJON AV Rb OG LUX-VIRUSINFEKSJON AV TUMORCELLE-LINJER

Som et eksempel på anvendelse av genterapi ble klonede RB-gener anvendt i in vivo- og in vitro-studier. I dette henseendet ble klonede RB-gener ført inn i vevskulturer. Som

15 et annet eksempel ble klonede RB-gener levert profylaktisk til den ene siden av en nakne mus. Deretter ble carcinogener ført inn i begge sidene av den nakne musen. Tumorutvikling ble observert på den ene siden mens siden som var blitt behandlet profylaktisk med klonede RB-gener ikke viste tumorutvikling.

- 20 Produksjon av RB og lux-virus. To forskjellige amfotrofiske retrovirus ble konstruert som vist i fig. 1. Rb-virus besto av MuLV LTR (Moloney murin RB cDNA, og neo kondensert til RSV (Rous sarcom virus) promoter (LTR-RB-RSV-Nne-LTR) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:4709 (1983). Neo koder for Tn5 neomycin fosfotransferase som utviser resistens overfor neomycinanalog G418, og ble anvendt for å selekttere overfor
- 25 uinfiserte celler J. Mol. Appl. Genet. 1:327 (1982).

Det andre, Lux-viruset, var identisk med unntagelse av at RB var erstattet av luciferasegenet Mol. Cell. Biol. 7:725 (1987). Luciferasegenet virket ikke bare som en kontroll for spesifikke virkninger av RB-genet, men også som et middel for å undersøke ekspressjonseffektiviteten som et middel for å undersøke ekspresjonseffektiviteten til den virale konstruksjonen i forskjellige celletyper. Disse to plasmidene inneholdende proviralt DNA ble deretter transfektert inn i PA12-celler, som inneholder et pakke-defekt provirus og som uttrykker alle de nødvendige komponentene for virus-produksjon inkludert amfotrofisk kappeglycoproteiner Mol. Cell. Biol. 5:431 (1985) (fig. 1B).

35

Da dette trinnet danner meget få infeksiose virus, ble supernatanter høstet fra transfekterte PA12-celler anvendt for å infisere ekotropisk hjelpelinje psi-2 Cell 33:153 (1983);

ibid 37:1053 (1984). Individuelle G418-resistente kolonier ble isolert og screenet for virusproduksjon og RB-proteinekspresjon. Blandt 10 kloner som ble screent produserte åtte 10^3 - 10^5 G418-resistente cfu/ml når analysert med 208F rotte fibroblaster som indikatorceller.

5

Begge parentale kloner og infiserte rotte 208F-celler, uttrykte humant RB-protein (110 kD) i normal størrelse i tillegg til gnager RB-protein (125 kD) når merket med ^{32}P -ortofosfat og immunopresipitert med et polyklont anti-RB antistoff (anti-fRB), Nature 329:642 (1987). Til slutt ble esotropisk virus anvendt for å infisere PA12-celler og et antall G418-resistente kloner ble screenet for virusproduksjon og for ekspresjon av humant RB-protein. Fem av ti kloner uttrykte RB-protein, og det høyeste titeret er 4×10^4 cfu/ml. Lux-virus ble oppnådd ved en lignende prosedyre ved unntagelse av at kolonier ble screenet for luciferaseekspressjon (Fig. 1B); og det høyeste titeret var 1×10^5 cfu/ml. Disse to virale stammene ble anvendt for alle studiene beskrevet nedenfor.

15

Infeksjon av tumorcellelinjer; og ekspresjon av RB-protein.

Retinoblastom-cellelinjen WERI-Rb27 og osteosarcom cellelinjen Saos-2 inneholder inaktiverte RB-gener, som vist ved fravær av normalt RB-protein, Nature 329:642 (1987); J-Y Shew et al. upublisert. Begge cellelinjene hadde delvis delelsjoner av RB-genet, Proc Natl. Acad. Sci 85:2210 (1988); ibid 85:6017 (1988) og blir betegnet RB-celler. En annen osteosarcom-cellelinje, U-20S, uttrykte RB-protein i normal størrelse og hadde tilsynelatende normale RB-alleler, Nature 329:642 (1987). Disse cellelinjene ble anvendt som mottagere for infeksjon med RB og Lux-virus. På grunn av lavt titer og effektiv infeksjon med amfotrofisk retrovirus, inkluderte alle analysene seleksjon med G418 for å fjerne uinfiserte celler. Etter infeksjon med RB-virus og G418-seleksjon uttrykte RB-cellelinjene RB-protein med normal størrelse når merket med ^{32}P -ortofosfat (fig. 2A, kolonnene 2 & 4); Lux-infiserte RB-celler uttrykte ikke RB-protein. Som ventet ble RB-proteinekspressjonen i U-20S-cellene ikke detekterbart endret etter infeksjon med RB-virus på grunn av tilstedeværelse av endogent RB-protein. G418 resistens til selekterte kloner viste at viral infeksjon hadde oppstått.

30

For videre å verifisere det uttrykte RB-proteinet i tumorceller, ble dets cellulære beliggenhet undersøkt. Det meste av det endogene RB-proteinet var lokalisert til kjernen i U-20S-celler, som angitt ved både cellefraksjonering og immunofarging. RB-virus-infiserte Saos-2 celler ble immunofarget ved anvendelse av anti-fRB-antistoff. Kjernene var sterkt positive for brun kromofor og dette viser lokalisering av RB-protein. Lux-virusinfiserte celler var helt umerkede under samme betingelser. Det uttrykte RB-proteinet

35

kunne dermed ikke skjelnes fra nativt RB ved tre hovedbiokjemiske indekser (molekylvekt, cellulær beliggenhet og fosforylering). RB-genekspresjon i celler infisert med RB-virus ble registrert ved immunopresipitering med anti-fRB antistoff før alle påfølgende eksperimenter.

5

For å bestemme om opprettelse av RB-proteinekspresjon i RB-celler innvirket på celledmorfologi og hemmet veksten ble in vitro-virkningene av RB-genekspresjon undersøkt. Kulturer av RB og Lux-virusinfiserte tumorceller ble sammenlignet etter G418-seleksjon som illustrert i figurene 3A-3F. Morfologien til U-20S-cellene dyrket som et monolag, var uforandret etter infeksjon med hvilket som helst virus. Monolagskulturen til Saos-2-cellene var uforandrede etter Lux-virus-infeksjon, men viste klare morfologiske endringer etter RB-virus-infeksjon. På begynnelsen av andre uke etter infeksjon, ble to bestemte cellulære populasjoner av G418-resistente celler observert å være reproduerbare. Hovedmengden av cellene ble flate og veldig forstørret i gjennomsnittlig diameter (3-10 ganger) sammenlignet med Lux-virus-infiserte eller -uinfiserte celler (figurene 3A-3F). De gjenværende cellene var mindre og lignet uinfiserte parentale celler. Etter fire uker i kultur og ytterligere overføring ble de større cellene erstattet av mindre celler som lignet parentale eller Lux-virus-infiserte Saos-2-celler. Suspensjonskulturer av WERI-Rb27-celler var også uforandret av Lux-virus-infeksjon. Fire uker etter Rb-virus-infeksjon fremkom moderat forstørrede celler som økte mange ganger i antall opp til 8 uker. Store klumper av døde celler ble også observert på begynnelsen av seks uker (figurene 3A-3F). Etter forlenget dyrking (<10 uker) ble mindre celler som lignet parental eller Lux-virusinfiserte celler på nytt den dominante celletype.

10

15

20

25

30

35

Variasjon i antallet av disse morfologisk distinkte populasjonene indikerer at de to celletypene var forskjellige i hastighet når det gjaldt celledeling og/eller levetid i kultur. Denne forskjellen ble kvantifisert for monolagsosteosarcom-celler ved anvendelse av kolonivekstanalyse. Infiserte Saos-2 og U20S-celler ble utplatet med lav tetthet og individuelle kolonier dannet av disse cellene ble identifisert (figurene 4A og 4B). Antall celler i hver koloni, talt under et mikroskop, ble fulgt i fem dager. Med Saos-2-cellene vokste hovedparten av koloniene dannet av Rb-virus-infiserte celler saktere enn kolonier av Lux-virusinfiserte celler, eller stoppet å vokse etter noen få dager (fig. 4A). Noen få hurtigvoksende kolonier var imidlertid alltid tilstede. Kolonier av U-20S-celler infisert med ett av virusene hadde ikke forskjellig vekstrate (fig. 4B). Subpopulasjoner av WERI-Rb27 celler kunne ikke bli oppsporet separat på grunn av at cellene vokste i suspensjon. Bulk-populasjonsvekst av WERI-Rb27-kulturer var derimot langsommere etter Rb-virusinfeksjon. Disse resultatene tyder på at gjenopprettelse av RB-protein-eks-

presjon i RB-celler influerer på cellemorfologi og hemmer veksten.

- Det ble spekulert om Rb-virus-infiserte Saos-2-tumorceller som delte seg hyppig til tross for G418-seleksjon, ikke ble hemmet pga. et defekt viralt RB-gen. For å teste dette
- 5 forslaget ble hurtigvoksende kolonier av Saos-2 celler klonet og dyrket til massekulturer, og ekspresjon av RB-proteinet ble undersøkt ved immunopresipitasjon. Som vist i fig. 5 hadde ni av ni kloner fullstendig tapt RB-proteinekspresjon til tross for fortsatt G418-seleksjon. På grunn av at RB-virusinfiserte Saos-2-celler i tidlig kultur uttrykte RB-protein (Fig. 1) ble det utledet at små, hurtigvoksende celler ikke inneholdt RB-pro-
- 10 tein. Inaktivering av proviralt RB-gen var ikke uventet på grunn av at native eller rekombinante retrovirus muterer hyppig eller har epigenetisk suppressjon av genekspressjon, *Viol.* 46:939 (1971); *J. Virol.* 17:74 (1976); *ibid* 50:42 (1984); *Mol. Cell. Biol.* 6:1141 (1986).
- 15 Med referanse til figurene, fig. 1A, beskriver konstruksjon av Rb-virus. Plasmidene pLLRNL og pGem1:Rb4.7 ble spaltet med restriksjonsendonukleaser som vist, og hensiktsmessige fragmenter ble ligert for dannelsen av pLRbRNL. Bare selekterte restriksjonssteder er vist (H, Hind III; C, Cla I; S, Sma I; Sc, Sca I; R, EcoR I). LTR, lang terminal gjentakelse til moloney murin leukemi-virus; Lux, luciferasegen; RSV, Rous sarcomaviruspromoter; Neo, Tn5 neomycin-resistensgen; Am^r, ampicillinresistensgen; Rb, RB cDNA (4757 bp); TGA, stopp-kodon.
- 20

- Fig. 1B vedrører produksjon av amfotropiske Rb og Lux-virus. Plasmidene pLRbRNL eller pLLRNL ble transfektert inn i amfotrofisk pakkingscellelinje PA12 ved
- 25 kalciumfosfat-presipitasjon. Virale supernatanter ble høstet etter 48 timer og anvendt for å infisere ekotrofisk pakkingscellelinje psi-2. Etter 3-4 uker med G418-seleksjon ble resistente kolonier analysert for virusproduksjon ved infisering av 208F rotte-fibroblaster. RB eller Lux-genekspressjon i G418-resistente 208F-kolonier ble analysert ved immunopresipitasjon med anti-FRB antistoff for Rb-virus, eller ved
- 30 deteksjon av luciferase-aktivitet for Lux-virus. Virus⁺ og Rb⁺ eller lux⁺ kloner ble selektert som ekotrofiske stamlinjer. Virale supernatanter ble anvendt for å infisere PA12-celler og amfotrofiske stamlinjer ble isolert ved gjentakelse av prosessen med G418-seleksjon og analyse av neo^r-kolonier for virusproduksjon og RB eller Lux-genekspressjon.
- 35

Figurene 2Ba og 2Bb viser ekspresjon av RB-proteini Rb-virus-infisert retinoblastom og osteosarcom-cellelinjer. I Fig. 2A, WERI=Rb27 (kolonnene 1 & 2), Saos-2

(kolonnene 3 & 4) og U-20S (kolonnene 5 & 6) ble cellene infisert med Rb-virus (kolonnene 2,4 & 6) eller Lux-virus (kolonnene 1, 3 & 5) og dyrket i nærvær av G418 (800 µg/ml for Saos-2 og U-20S og 1,0 mg/ml for WERI-Rb27) i 2 uker (Saos-2 og U-20S) eller 4 uker (WERI-Rb27). Cellene ble merket med ^{32}P -fosforsyre (0,25 mCi/ml) i tre timer. Cellulære lysater ble immunopresipitert med kanin anti-fRB IgG (14) og analysert på 7.5% SDS-polyakrylamidgeler som beskrevet. RB-protein (pp110^{RB}) er vist.

I figurene 2Ba og 2Bb ble Saos-2-cellene infisert med Lux-virus (panel a) eller Rb-virus (panel b) og dyrket i G418-inneholdende medium i 3 uker i 60-mm skåler. Skålene ble vasket med PBS mellom hvert av følgende trinn: cellene ble fiksert med 4% formaldehyd i 0,04M fosfatbuffer (pH 7,4) i 20 minutter, og nedsenket i 1% H₂O₂ i 0,04M fosfatbuffer i 10 minutter. Fikserte celler ble preinkubert med normalt geiteserum i 10 minutter og deretter inkubert med kanin anti-fRB IgG fortynnet i 0,02% Triton X-100 over natten. Etter vasking ble biotinyllert geite-anti-kanin IgG (TAGO, Burlingame, CA) tilsett til skålene. En time senere ble cellene inkubert med AB-kompleks konjugert med pepperrotperoksidase (Vector Labs, Burlingame, CA) i 30 minutter og deretter inkubert med substrat (0,05% 3,3'-diaminobenzidin tetrahydroklorid og 0,01% H₂O₂ i 0,05 M Tris-HCl, pH 7,6). (Polysciences, Inc.). Reaksjonene ble stoppet 3-5 minutter senere ved vasking av cellene med PBS. Cellene ble fotografert med et Nikon diafotomikroskop.

Figurene 3A-3F viser morfologiske virkninger av Rb eller Lux-virus infeksjon i retinoblastom og osteosarcom cellerlinjer. WERI-Rb27 (a & d), Saos-2 (b & e), og U20S (c & f) celler ble infisert med Lux-virus (a-c) eller Rb-virus (d-f) og dyrket i G418-inneholdende medium (konsentrasjoner som i fig. 2A) i 8 uker (WERI-Rb27) i 4 uker (Saos-2 og U-20S). Cellene ble fotografert i fasekontrast med et Nikon diafotomikroskop (forstørrelse x 320 i alle panelene). Pilen peker mot en forstørret WERI-Rb27-celle mens pilhodet peker mot en normal-størrelse WERI-Rb27-celle.

Figurene 4A og 4B illustrerer grafisk vekstvirkningene til Rb- og Lux-virusinfeksjon på retinoblastom og osteosarcom-celler. Suspensjonskulturer av WERI-Rb27-celler (A) ble infisert med Rb-virus (firkanter) eller Lux-virus (sirkler) i 2 dager og dyrket i nærvær av G418 i 8 uker. 1×10^5 celler ble deretter sådd ut i 200 µl kulturmedium i individuelle brønner av 96-brønn mikrotiterplater (dag 0). Tre brønner ble høstet på hver av dagene 1 til 5 og telt i et hemacytometer. Gjennomsnittlig celletall/brønn (+ 1 S.D.) er vist. Monolagskulturer av Saos-2 (B) og U-20S (C) cellene ble infisert med Rb-virus (firkanter) eller lux-virus (sirkler) i to dager, deretter sådd ut i 60 mm skåler og dyrket i G418-in-

neholdende medium i 7 dager. Like antall neomycin-resistente kolonier var tilstede i hver skål; og omtrent 50 tilfeldig selekterte kolonier ble merket og antall celler i hver koloni ble bestemt under mikroskop (dag 1). Antall celler i samme kolonier ble målt i løpet av de neste 4 dagene. Gjennomsnittlig celletall/koloni (+ 1 S.D.) er vist. I skålene med Rb-virus-infiserte Saos-2-celler, var to subpopulasjoner av koloniene klart forskjellige i en saktevoksende (n = 41, fylte firkanter) og en hurtigvoksende (n = 6, tomme firkanter); og disse ble plottet separat.

I fig. 5 er RB-geneekspressjon i hurtigvoksende Saos-2 kolonier infisert med Rb-virus vist. Individuelle, hurtigvoksende Saos-2-kolonier (kolonnene 1-9) ble isolert og dyrket til massekulturer i G418-inneholdende medium. Disse cellene og U-20S-cellene (kolonne C) ble merket med ^{32}P -fosforsyre og cellulære lysater ble immunopresipitert som beskrevet i forhold til fig.2A ovenfor. RB-protein (ppRB¹¹⁰) er indikert.

For å undersøke innvirkningen av RB-protein på forankrings-uavhengig vekst ble osteosarcom-celler infisert med enten Rb- eller Lux-virus analysert for deres evne til å vokse i softagar, J. Virol. 38:1064 (1981). Forskjellige celletettheter ble opprinnelig sådd ut og antallet resulterende kolonier ble registrert. Som vist i tabell 2 var kolonidannelsen til Rb-virusinfiserte Saos-2-celler markert redusert sammenlignet med uinfiserte eller Lux-virus-infiserte celler. I kontrast til dette varierte kolonidannelsen til U-20S-cellene ikke mye med hensyn på infeksjonstype (tabell 2). Disse data viser at Saos-2-kolonier dannet i softagar kan bli avledet fra hurtigvoksende celler. Derfor var forankrings-uavhengig vekst forsinket av eksogent RB-protein i osteosarcom-celler som mangler endogent RB-protein.

TABELL 2

Softagar kolonidannelse av Rb eller Lux-virus-infiserte osteosarcomceller

Utsådd celleantall	Koloniantall				
	Saos-2			U-20S	
	Lux	Rb	-	Lux	Rb
1.0 x 10 ⁵	TMTC	306	56	394	340
2.5 X 10 ⁴	124	138	7	109	151
					90

Celler infisert med Rb eller Lux-virus ble dyrket i G418-inneholdende medium i 10 dager. Levedyktige G418-resistente og parentale celler (-) ble sådd ut i duplikat i forskjellige fortyninger i 0,35% softagar som beskrevet (24). Totalt koloniantall ble registrert etter 20 dagers vekst. Individuelle kolonier av Saos-2 inneholdt mer enn 50 celler, mens

U-20S innholdt omtrent 30 celler. TMTC: For mange å telle.

- En viktig eksperimentell test på neoplastisk adferd, er evnen for injiserte celler til å danne tumorer i nakne mus. Tap av tumorgenisitet er den viktigste bekreftelsen for suppresjon av neoplastisk fenotype til RB-genet. WERI-Rb27 ble betraktet som en god kandidat for tumorgenisitsanalyse siden den dannet tumorer i nakne mus tre uker etter injeksjon av $1-2 \times 10^7$ celler (tabell 3).

- Derimot var Saos-2 og U-20S bare svakt tumorgene. To eksperimenter ble utført med WERI-Rb27 celler, én tre uker og én fem uker etter infeksjon med hvert virus der 2×10^7 levedyktige, infiserte WERI-Rb27-celler ble injisert inn i sidene til nakne mus; og høyre side ble anvendt for Rb-virus-infiserte celler og venstre side av samme mus ble anvendt som kontroll med Lux-virusinfiserte tumorceller. Syv av syv mus dannet tumorer bare på venstre side (fra Lux-virusinfiserte celler), mens null av syv dannet tumorer på høyre side (fra Rb-virus-infiserte celler) etter bilaterale injeksjoner av WERI-Rb27-celler infektet som ovenfor (tabell 3). Eksogent RB-protein undertrykte tumordannelse i en meget tumorgen retinoblastom-cellelinje. Rb-virusinfeksjon forsinket veksthastigheten til Saos-2 kulturene betraktelig, slik at det var umulig å akkumulere tilstrekkelig antall infiserte celler for vår analyse.

20

Disse in vitro- og in vivo- resultatene underbygger konklusjonen om at erstatning av RB-tumorcellene undertrykte deres neoplastiske adferd, mens tumorceller med tilsynelatende normale RB-gener ikke var påvirket.

25

TABELL 3

Tumorgenisiteten til RB eller Lux-virusinfiserte WERI-RB27-celler

Eksperiment #	Antall mus med tumor / Antall mus injisert		
	Parental	Lux	Rb
1	5/5	5/5	0/5
2	-	2/2	0/2

- 30 Celler infisert med Rb- eller Lux-virus ble dyrket i G418-inneholdende medium i 3 uker (eksperiment 1) eller 5 uker (eksperiment 2). Cellelevedyktighet ble verifisert ved trypan-blå eksklusjon, og 2×10^7 levedyktige, virus-infiserte celler ble injisert subkutan i én av sidene til samme nakne mus. Det samme antall uinfiserte, parentale celler ble inji-

sert i andre mus. Tumordannelsen ble registrert etter to måneder som tilstedeværelse eller fravær av en palperbar tumormasse. – betyr: ikke utført.

E2. ANVENDELSE AV RB-GENET I CANCERSUPPRESJON

- 5 På grunn av at to forskjellige betydninger er knyttet til betegnelsen "cancersuppresjon" kan følgende distinksjon beskrives. Deteksjon av inaktiverende mutasjoner av RB-genet i naturlige humane tumorer understøtter idéen om at RB-genet normalt "supprimerer" eller "forhindrer" tumordannelse i mottagelige forløperceller. Dette impliserer imidlertid ikke nødvendigvis at erstatning av dette genet ville "supprimere" eller "revertere" neo-
- 10 plastiske celler til mere normal adferd senere i deres utvikling. Det at RB-genet ikke kan undertrykke RB-tumorceller kan være forårsaket av ervervelse av ytterligere, multiple endringer i løpet av onkogenesen. For å undersøke disse mulighetene ble intervensjons-
- eksperimenter utført. I denne opprinnelige studien ble et normalt RB-gen introdusert ved viralfremidlet genoverføring inn i dyrkede humane tumorceller som manglet endo-
- 15 gent RB-protein. Suppresjon av den neoplastiske fenotypen ble observert både in vitro, så som softagar-kolonidannelsen, og ved en in vivo-analyse som omfattet tumorgenisitet i nakne mus. Derfor tilfredsstilte det klonede resinoblastomgenet en definisjon av et hu-
- mant cancersupprimerende gen: det undertrykte den neoplastiske adferden til visse tu-
- morceller. Som ventet ble ingen suppresjonsvirkninger av eksogent RB-protein obser-
- 20 vert i tumorceller som inneholdt et intakt endogent RB-gen.

- Tester har vist at RB-genet har en rolle i undertrykking av mange typer humane cancere. RB-genet ble opprinnelig definert som det genetiske elementet som er følsomt overfor arvelig retinoblastom. Barn som overlever denne formen for retinoblastom er meget pre-
- 25 disponerte for andre primære tumorer senere i livet, og dette tyder på en større rolle for RB-genet i andre cancerformer, J. Cell.Biochem. in press (1988). Mutasjoner i RB-genet blir ofte detektert i retinoblastomtumorer, og den mest sensitive indikatoren er fravær av RB-protein, som er blitt observert i alle retinoblastomer som er blitt testet frem til nå, Nature 329:642 (1987). Ved anvendelse av lignende teknikker er fullstendig inak-
- 30 tivering av RB-genet også funnet i forskjellige ikke-retinoblastomtumorer så som osteosarcom, synovialsarcom og andre bløtvevs-sarcomer, brystcarcinom og småcelle-lungecarcinom, Cancer Res. 48:3939 (1988); Hum. Pathol. 19:487 (1988); Proc. Natl. Acad. Sci. 84:9059 (1987); Science 241:218 (1988); ibid 241:353 (1988); J.Y. Shew et al. upublisert. Det er dermed blitt vist at et normalt RB-gen har cancerundertrykkende akti-
- 35 vitet, ikke bare i retinoblastomceller, men også i RB-osteosarcom-celler og lignende effekter er blitt observert i RB-brystcancer-celler (E.Y.-H.P. Lee & W.-H. Lee, upublisert). Sammen med observasjonen av RB-mutasjoner i naturlig humane tumorer understøtter

disse resultatene konklusjonen om at tap av dette genet er et kritisk trinn, kanskje det begynnende trinnet i genesen av flere typer humane cancerformer.

Inngitt US-patentsøknad serie nr. 108,748 beskriver og krever RB-genet og dets klon.

5 RB-genet og dets klon har nukleotidsekvens som angitt i tabell 2.

TABELL 4

[illegible]

E3.SUPPRESJON AV ONKOGENISITETEN *IN VITRO* OG *IN VIVO* VED RB-GENET E4

- (a) Ekspresjonsvektorer inneholdende funksjonelle RB cDNA-kloner ble dannet som følger: Et full-lengde 4.7 kb RB cDNA ble konstruert fra tre overlappende cDNA-sekvenser, RB-1, RB-5, og Y79RB. Dette cDNA er plassert under kontroll av enten SV40
5 tidlig genpromoter eller LTR Moloney murin-leukemivirus og er satt inn i en retroviral vektor (MuLV-LTR-neo).
- (b) Produksjon av RB-virus: Infeksiøse virus inneholdende RB-gener blir dannet fra
10 pakkings-cellelinjene 2 etter viral DNA-kalsiumfosfat-kopresipitasjon i nærvær av polyben. 48 timer senere blir supernatanten inneholdende ecotrofisk RB-neo-virus høstet og anvendt for å infisere pA12-celler, som er en annen hjelpelinje som tilveiebringer amfotrofisk kappeprotein. På grunn av at bare en liten fraksjon pA12-celler blir infisert med ecotrofisk RB-neo-virus, blir de positivt infiserte pA12-cellene anriket un-
15 der G418-seleksjon for neo-resistent fenotype. Virale partikler frigjort fra infiserte pA12-celler er pseudotypiske med amfotrofiske kappeproteiner og kan infisere arter som er forskjellig fra gnagere. Viruset kan undersøkes for tilstedeværelse av RB-genet enten ved hybridisering med RB-probe eller ved dets evne til å uttrykke RB-proteiner.
- (c) Fenotypiske forandringer av retinoblastom-celler til RB-genet: Flere linjer av retinoblastom-celler, så som Y79 eller WERI-1 kan produsere palperbare tumorer i nakne
20 mus i løpet av 4 uker. Disse cellene ble infisert med infeksiøs virus inneholdende det funksjonelle RB-genet, og deretter analysert for deres tumorgenisitet. I mellomtiden ble ekspresjonen av RB-genet i disse infiserte cellene undersøkt. LTR-neo virus som kun
25 inneholdt neo-gener ble anvendt som kontroll. I tillegg ble det infeksiøse RB-viruset direkte inokulert inn i etablerte retinoblastomtumorer i nakne mus og suppresjonen av tumorveksten ble undersøkt.

E4.TRANSFORMASJON VED INAKTIVERING AV RB-GENER

- (a) Infeksiøs virus inneholdende defekte RB-sekvenser ble konstruert i likhet med prosedyrene beskrevet ovenfor, og anvendt for målstyrt mutagenese av endogent RB-gen.
30
- (b) Fibroblaster fra retinoblastompasienter, så som GM 1142 og S-362 inneholdt bare én enkelt kopi av det funksjonelle RB-genet og ble anvendt som målceller for inaktivering
35 av RB-genet ved homolog rekombinasjon. Kolonier resistente overfor G418 er kjennetegnet ved følgende parametre; (1) innskuddsrate; (2) ekspresjon av RB-proteiner; og (3) transformerende fenotype både in vivo og in vitro.

Et bilde på cancerundertrykkende karaktertrekk til RB-genet, anvendelse av genet eller klonen som et legemiddel er blitt dannet. I tillegg kan RB-genet bli anvendt for profylaktisk prenatal og postnatal screening, og for å kunne forutsi utvikling av sekundær cancer, så som osteosarcom, fibrosarcom, glioblastom, brystcancer og andre, om de er tilknyttet retinoblastom eller ikke.

Det er å bemerke at en annen anvendelse er suppresjon av cancertvekst ved å tilveiebringe RB-gen cDNA direkte til tumorcellene, produktet ppRB¹¹⁰ vil deretter virke på andre tumorholdige celler.

Til tross for at diagnostiske og profylaktiske metoder med hensyn på RB-genet er blitt beskrevet, må det forstås at foreliggende oppfinnelse skal dekke anvendelse av et hvilket som helst erstatningsgen som et legemiddel for å behandle dyr, inkludert mennesker, som har en cancertilstand eller som har inaktive, muterte, eller defekte cancersuppreserende gener. Injisering, behandling eller annen hensiktsmessig behandling av dyret som har et defekt gen med dets identiske eller nesten identiske, naturlige eller klonede ikke-defekte gen eller genfragment og/eller forebygge cancer, er ment å være omfattet av denne oppfinnelsen.

F. DYREMODELLER FOR Å EVALUERE ANTATTE MILJØPÅVIRKNINGER PÅ CARCINOGENISITET

For å bestemme carcinogenisiteten av antatte miljøpåvirkninger blir det cancersuppreserende genet til en dyremodell kontrollert ved genetisk manipulasjon for å gjøre den mottagelig for carcinogene innvirkninger. I dette henseendet blir ett av et par cancersuppreserende gener gjort inaktivt, slik at avkommet til dyret kan bli utsatt for det ventede carcinogenet fra omgivelsen for testing.

Tumorutvikling i dyr eksponert på denne måten er en positiv indikasjon på carcinogenisitet til den antatte påvirkningen fra omgivelsen.

Som et eksempel på produksjon av en musmodell for vurdering av carcinogenitet til antatte miljøpåvirkninger, er en muse-stamme med heterogenisitet for RB-genet blitt utviklet. Eksponering av musen for et carcinogen resulterer i endring av det dominante RB-genet som derved resulterer i produksjon av homozygot, resessiv tilstand med påfølgende tumorutvikling.

Forståelse av det molekylære grunnlaget for transformering av en normal celle til en tumorcelle er en stor utfordring for vitenskapsfolk som studerer tumorgenese. For mange eksperimentelle tumorer er mange stadier av carcinogenesis blitt demonstrert, Nature, 315:190, (1985). Senere studier har vist at aktiveringen av onkogenene kan
 5 være involvert i initiering av carcinogenesis, og mange onkogener kan være nødvendig for å udødeliggjøre normale celler og for ekspresjon av transformerende fenotype, Nature 304:596, (1983). Disse onkogenene er dominant virkende gener og ekspresjonen til disse genproduktene i overskuddsmengde eller i endret form, er nødvendig for ondartet transformasjon.

10

Et paradoks i cancerbiologi er oppstått fra studier med cellehybridisering mellom normale og maligne celler. Det er blitt vist at den tumorgene aktiviteten til maligne celler kan bli undertrykket av gener eller kromosomer fra normale celler og maligniteten til hybridcellen reverserer etter tap av DNA fra normale celler. Dette tyder på at tumorgenisiteten er resessiv av natur og inaktivering av disse "tumor-suppresserende gener" kan
 15 også involveres i initiering av human tumorgenese, Science, 238:1539, (1987).

Karyotypisk undersøkelse av somatiske celler (fibroblaster) fra pasienter med arvelig retinoblastom har i noen tilfeller vist synlige delesjoner av de lange armene til kromosom 13, Birth Defects, 12:131, (1976). Lignende defekter ble observert i retinoblastom-tumorcellene, Cancer Genet. Cytogenet. 6:213, (1982). Bånd q14 var felles blandt alle delesjoner og inneholder sannsynligvis et hypotetisk gen (RB) som bestemmer følsomheten for arvelig retinoblastom. Basert på den kliniske observasjonen er det blitt
 20 foreslått at initieringen av tumorgenese kan resultere i fra så få som to mutasjonshendelser, og at retinoblastom oppstår som følge av tap av begge alleler i samme locus, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 68:820 (1971); Cancer, 35:1022, (1975). Tilstedeværelse av det hypotetiske genproduktet vil hindre eller undertrykke tumorgenese, mens tap av genfunksjon vil resultere i ondartet vekst.

Et gen på kromosom 13 er blitt identifisert som RB-genet, Science, 235:1394 (1987); Nature, 323:643 (1986). Det koder for et 4.7 kb mRNA-transkript, uttrykt i de fleste normale celler, inkludert føtal netthinne. Delvis eller fullstendig delesjon av dette genet ble detektert i 2 av 6 retinoblastomer som ble undersøkt, mens 4 hadde tilsynelatende intakte gener. RB mRNA var derimot endret i 6 av 6 retinoblastomer som ble undersøkt
 25 og forandringene inkluderte enten ekspresjon av forkortet mRNA message (4.0 kb istedenfor 4.7 kb) eller fravær av ekspresjon. Fullstendig tap av RB-genfunksjon i retinoblastomer ble videre bekreftet på proteintranslasjons-nivået.

30

Antistoff dannet mot et segment av RB-genproduktet kan immunopresipitere et protein på 110 kD i normale celler og i mange ikke-retinoblastomceller. Dette ene 110 kD-proteinet var imidlertid fraværende i 5 av 5 retinoblastomer som ble undersøkt. Dette indikerer at proteinet er viktig i onkogenesisen av retinoblastom. Dette proteinet ble videre funnet å være et fosfoprotein med DNA-bindende aktivitet med beliggenhet i kjernen, som dermed foreslår en regulatorisk rolle i ekspresjon av gener. Som diskutert ovenfor er fosfoproteinets blitt identifisert som ppRB¹¹⁰.

- 10 Ytterligere genetisk identifikasjon av RB-genet kan bekreftes ved dets forventede biologiske funksjoner. To hovedspørsmål kan stilles: 1) Om onkogenisiteten til retinoblastomcellene blir undertrykt ved tilstedeværelsen av funksjonelle RB-genprodukter; og 2) om fraværet av det funksjonelle RB-genet resulterer i den maligne fenotypen. Innføring av kromosom 11 i Wilms tumorceller resulterte i suppresjon av tumorgenisitet i
- 15 nakne mus til tross for at disse cellene forble morfologisk transformert i vevskultur, Science, 236:175 (1987).

- Det er også av interesse om ett enkelt RB-gen kan undertrykke tumorgenisiteten til retinoblastomceller. Målstyrt mutagenese ved homolog rekombinasjon er blitt anvendt for
- 20 å inaktivere genet for myosin tung kjede i Dictyosteliym discoideum, Science, 236:1086, (1987). Målstyrt mutagenese med homolog rekombinasjon er også blitt vist i diploide celler samt muse-embryonale stamceller, Cell, 44:419, (1986); Cell, 51:503, (1987). Inaktivering av RB-genet ved målstyrt mutagenese tilveiebringer derfor viktig informasjon om dets rolle i regulering av celleveksten og dets onkogene potensiale. I tillegg kan RB-genets rolle i onkogenesisen av andre primære tumorer i retinoblastom-
- 25 pasienter studeres ved hjelp av disse fremgangsmåtene.

- For å studere RB-genfunksjonen ble en dyremodell utviklet. To potensielle dyremodeller for Lesch-Nyhan-syndrom er blitt utviklet. Nature, 326:292, (1987). Nature,
- 30 326:295, (1987). Begge musemodellssystemene ble avledet ved konstruksjon av kimære mus med HPRT-muterte muse-embryonale carcinom (EC) eller embryonale stam- (ES) celler som kan gi opphav til stamceller i kimærene. Disse kimærene muliggjør avledning av stammene til mutante mus som har samme biokjemiske defekt som Lesch-Nyhan-pasienter. Hensikten var å anvende enten muse-ES eller EC-celler for å etablere
- 35 kimære mus med et inaktivt allel av RB-genet.

Muse-ES eller EC-celler ble anvendt for å etablere kimære mus med et inaktivt allel av

RB-genet for studie av dets biologiske signifikans. Et allel av RB-genet til muse-ES-cellen (rb/rb) ble inaktivert ved målstyrt mutagenese med en viral vektor inneholdende RB-sekvenser. En annen seleksjonsmarkør, som oppstilles i ramme med RB-genet, men er inaktiv i defekt RB-virus, ble inkorporert for seleksjon.

5

Etter homolog rekombinasjon med endogen RB, ble markøren uttrykt under kontroll av endogen RB-regulatorisk sekvens og ble selektert sammen med neo-resistens. Neomycin-resistent ES-celle ble ytterligere undersøkt for (rb/-) genotype ved DNA-hybridisering med RB-probe og ble injisert inn i muse-blastocytter for å konstruere kimære dyr, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83:9065, (1986).

10

Resulterende kimære mus blir avlet for å oppnå en koloni før avlivning og undersøkelse av (rb/-) fenotype til primær fibroblast.

15

Oppfinnelsen med dyremodellen for å studere cancersupprimerende genfunksjon, blir nå presentert mer i detalj. To potensielle dyremodeller for Lesch-Nyhan-syndromet ble utviklet. Begge musemodell-systemene ble oppnådd ved konstruksjon av kimære mus med HPRT-muterte muse-embryonalt carcinom (EC) eller embryonale stam (ES) celler som kan gi opphav til stamceller i kimærene. Dette muliggjør en avledning av stammer av mutante mus som har samme biokjemiske defekt som i Lesch-Nyhan-pasienter. I foreliggende oppfinnelse ble muse-ES-celler anvendt som mål for RB-gen-inaktivering via homolog rekombinasjon.

20

Ekspresjon av RB-gen i forskjellige musevev ble undersøkt ved enten Northern blotting av poly(A) RNA med muse-DNA-prober eller immunopresipitering av muse RB-proteiner med RB-spesifikt antistoff. Ekspresjon av RB-genet i ES-cellene samt føtale netthinne-celler var hovedmålet for undersøkelse.

25

Et allel av RB-genene til muse-ES CELLE (rb/rb) ble inaktivert ved målrettet mutagenese med DNA-fragmenter inneholdende defekte RB-sekvenser. Tidligere var muse-RB cDNA blitt isolert ved anvendelse av human RB cDNA som probe. Flere muse-genomiske DNA-kloner ble isolert fra et muse-genomisk bibliotek ved screening med muse cDNA-probe. Disse muse-genomiske klonene ble anvendt for å konstruere DNA-fragmentet inneholdende en inaktivert RB-kodende sekvens.

30

Et neomycin-resistent gen avledet fra Tn5 ble satt inn i muse-genomiske DNA-fragmenter på 5.6 og 10Kb, idet neomycin og/eller G418 ble anvendt for seleksjon. Generelt kan

35

to vektortyper bli anvendt for målstyrt mutagenese basert på virkningsmåten til homolog rekombinasjon. Den første er en erstatningsvektor som bærer homologe sekvenser med samme orientering ved hver ende av vektoren og som resulterer i en nøyaktig kopi av genet i forhold til det interne neo^r genet. Den andre er en innskuddsvektor som bærer homologe sekvenser med motsatt orientering ved hver av endene til vektoren. Den opprinnelige DNA-leserammen vil fortsette dersom dette DNA-fragmentet blir sirkularisert. Når denne vektoren ble skutt inn i den nøyaktige posisjonen til det endogene RB-genet, ble en indre duplikering av deler av RB oppnådd, og dermed ble det inaktive RB-genet dannet. Begge vektortyper ble konstruert og inaktivering av RB-genene i ES-cellene ble oppnådd på begge måtene.

Det ble funnet at vektorer ført inn i ES-cellene integrerer enten tilfeldig i kromosomet eller integreres spesifikt i RB-loci. Dette gjør seleksjon av nøyaktig homologe rekombinanter eller enkel neomycin-resistent fenotypeseleksjon vanskelig. En annen seleksjonsmarkør ble derfor inkorporert for seleksjon.

Studier har vist at inkorporering av herpes simplex virus tk-gen inn i målrettet mutagenesevektor beskrevet ovenfor var fordelaktig. HSV tk-genet ble koblet til enden av en linearisert vektor. Dersom den tilfeldige integreringen av tk-vektoren oppsto, ville tk-genet bli båret over, inn i integreringssetet. Setespesifikk homolog rekombinasjon kan imidlertid bare oppstå etter tap av terminal tk-sekvens.

Nylig utvikling av forbindelser, så som acyclovir og ganciclovir, har tilveiebrakt et godt seleksjonssystem for celler med eller uten tk-genet *Antimicrob. og Chemother.*, 31:844-949 (1987). ES-celler med neo(+) og tk() ble derfor selektert ut ved tilsetning av G418 og ganciclovir. Vektorer med og/eller uten tk-genet ble begge anvendt for å teste effektiviteten til deres målstyrte mutagenese. Neomycin-resistente ES-celler ble ytterligere undersøkt for (rb/-) genotype ved DNA-hybridisering med en RB-probe.

Muse-ES-celler mutert på denne måten ble screenet for deteksjon av et inaktivt RB-allel og et aktivt allel av RB-genet ved RFLP-analyse samt polymerase-kjedereaksjonsanalyse. RB(+/-) ES-celler som ble oppnådd, ble gjeninnført ved mikroinjeksjon inn i blastocyster (tidlig embryo) oppnådd fra superovulerte hunn-mus. Blastocystene med RB (+/-) ES-celler ble deretter transplantert tilbake til livmoren til en pseudogavid hunn-mus *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83:9065, (1986). Etter at fostermor-musen fødte, ble avkommet undersøkt for arvelig overføring av det mutasjonsinaktiverede RB-allelet.

- Dyremodeller som er utviklet er nyttige for vurdering av antatt carcinogenitet hos miljøforbindelser. På grunn av at tumorgenisitet bare er observert når minst ett av de cancer-supprimerende genene ved et gitt locus er defekte, muterte eller fraværende, er tumorutvikling i dyret etter at det er utsatt for miljøforbindelsen, en positiv indikasjon på carcinogenitet for forbindelsen.
- 5

I tillegg til deres verdi i testing for forbindelsens carcinogenitet er det kimære dyret nyttig for vurdering av den farmasøytiske virkningen til RB-genet og RB-genproduktet.

- 10 Det har blitt oppdaget at administrering av RB-genet og/eller RB-genproduktene til friske celler ikke har noen negative sider. RB-genet og/eller produktet derav kan dermed administreres til organismer for å korrigere en genetisk feil, mens risiko for uønskede reaksjoner er blitt redusert.
- 15 Som anvendt heri skal betegnelse "defekte" og "inaktive" med referanse til et gen bety tilstanden der genet uttrykker en unormal fenotype eller ingen fenotype.

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte for fremstilling av en rekombinant viral partikkel for suppresjon av den neoplastiske fenotypen til en cansercelle som ikke har endogent villtype-retinoblastom-protein, k a r a k t e r i s e r t v e d

- i) å introdusere et villtype-retinoblastomgen eller et fragment derav, som koder for funksjonelt retinoblastom protein inn i en viral vektor ved å bruke en ligerings-metode,
- 10 ii) introdusere det rekombinante virale genomet inn i en celle, hvorved virale partikler blir produsert; og
- iii) blande den virale partikkelen med en farmasøytisk akseptabel bærer.

2.

15 Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor villtype-retinoblastomgenet eller et fragment derav blir introdusert inn i en retroviral vektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende utgangsmaterialer benyttes.

3.

20 Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor cansercellen som ikke har endogent villtype-retinoblastomprotein mangler villtyperetinoblastomgenet, k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende utgangsmaterialer benyttes.

4.

25 Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor cansercellen som ikke har endogent villtype-retinoblastomprotein har et mutert retinoblastom-tumorsuppressorgen, k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende utgangsmaterialer benyttes.

5.

30 Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor cansercellen som ikke har endogent villtype retinoblastomprotein er en osteosarkomcelle, lungekarsinomcelle, lymfomcelle, leukemicelle, bløtvevsarkomcelle, brystkarsinomcelle, blærekarsinomcelle eller prostatakarsinomcelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende utgangsmaterialer benyttes.

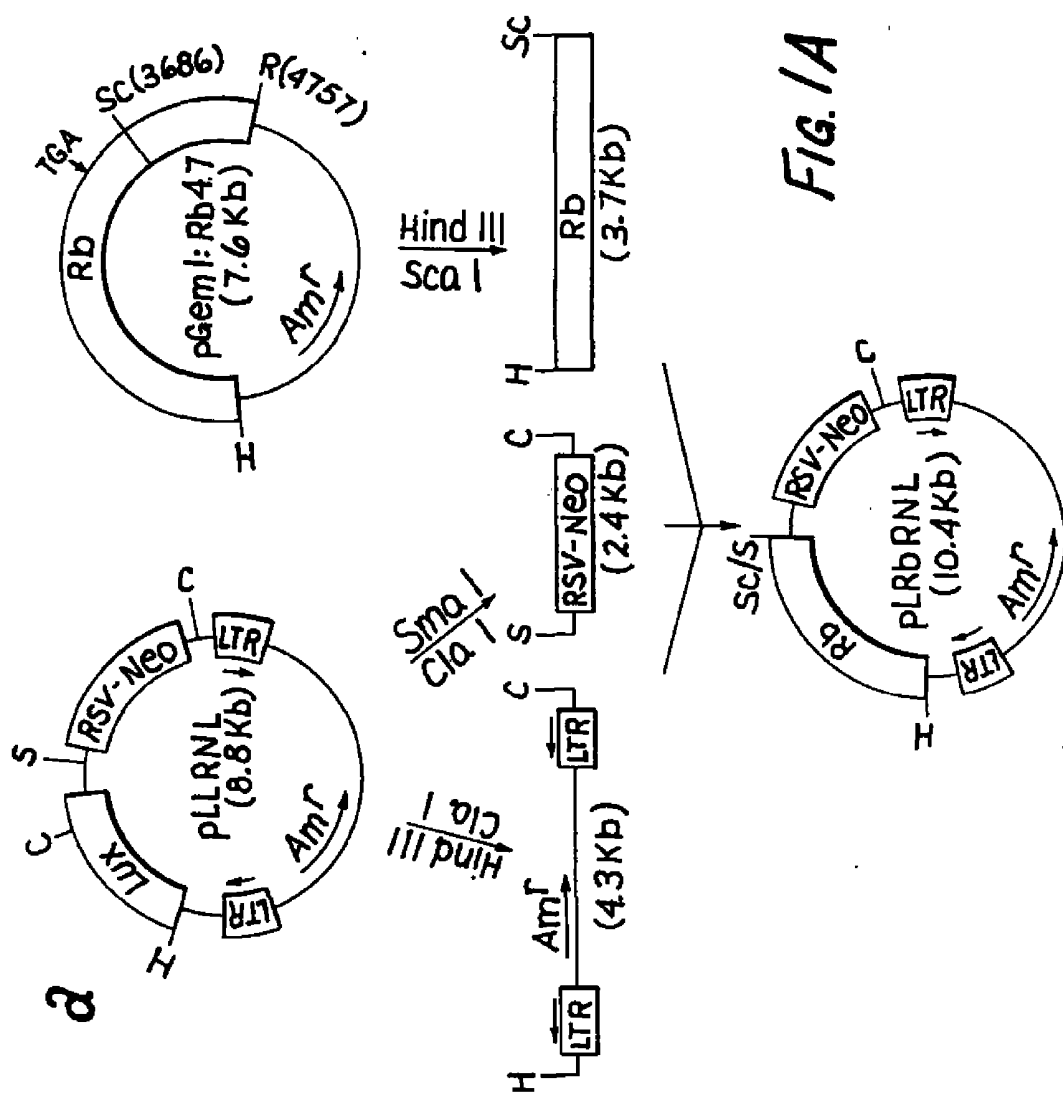
6.

Frengangsmåte ifølge krav 1, hvor retinoblastomgenet er som vist i tabell 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende utgangsmaterialer
benyttes.

5

7.

Frengangsmåte ifølge krav 1, hvor retinoblastomproteinet er som vist i tabell 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at tilsvarende utgangsmaterialer
benyttes.



b

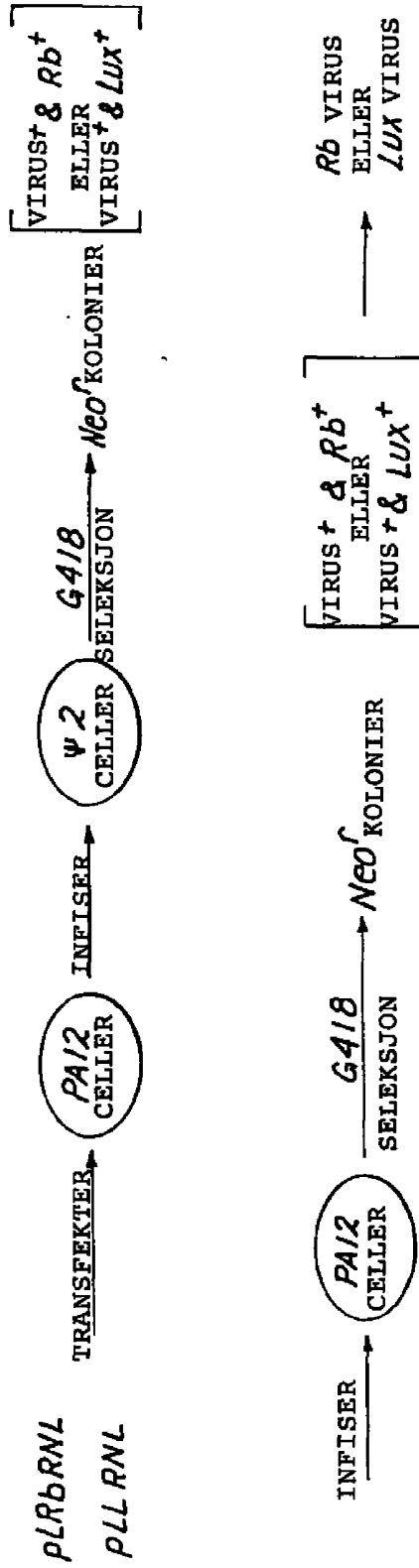


FIG. 1B

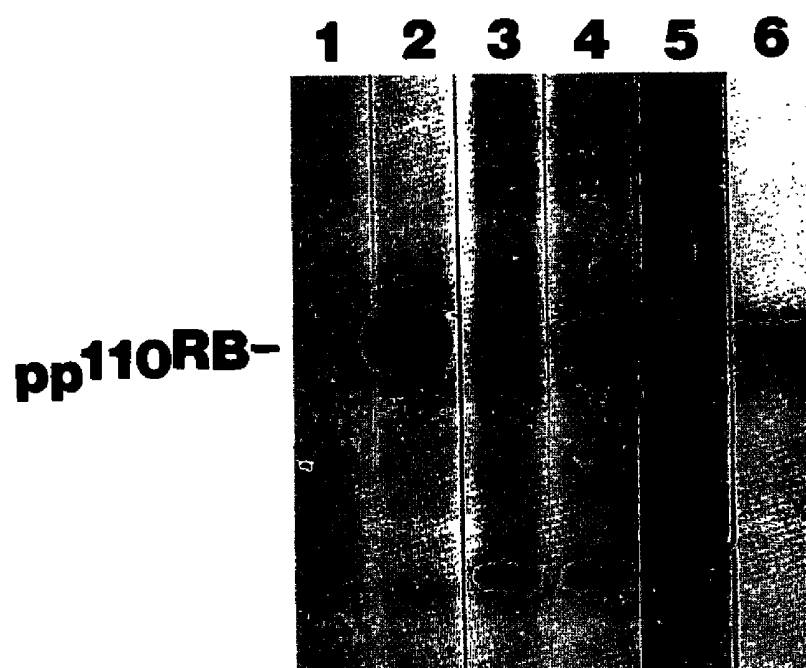


FIG. 2A



FIG. 2Ba



FIG. 2Bb

FIG. 3A

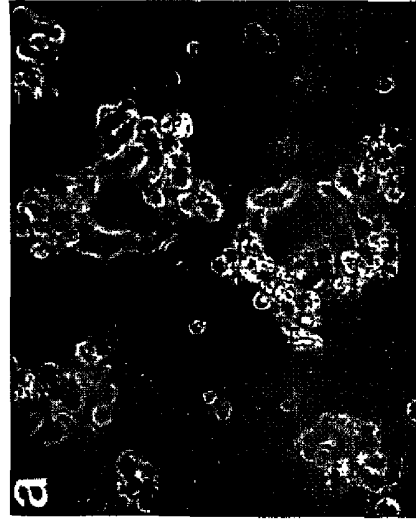


FIG. 3B

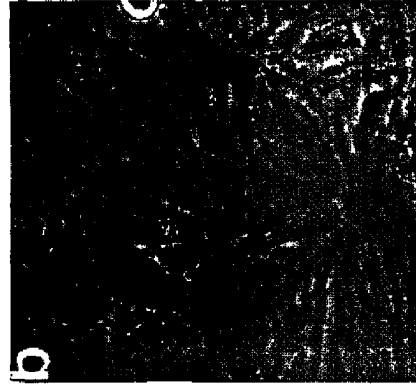


FIG. 3C



FIG. 3D

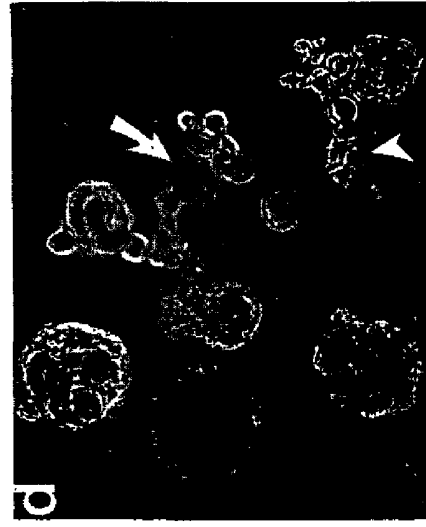


FIG. 3E

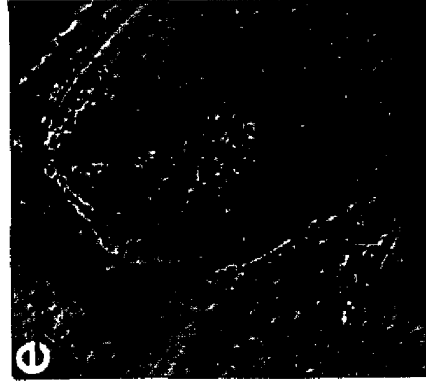
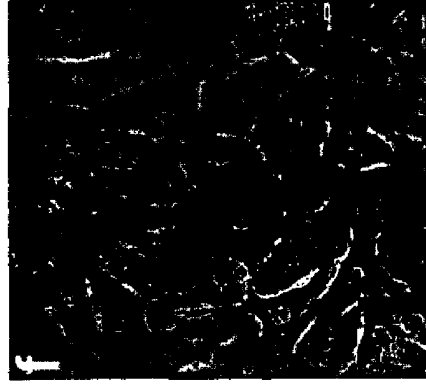


FIG. 3F



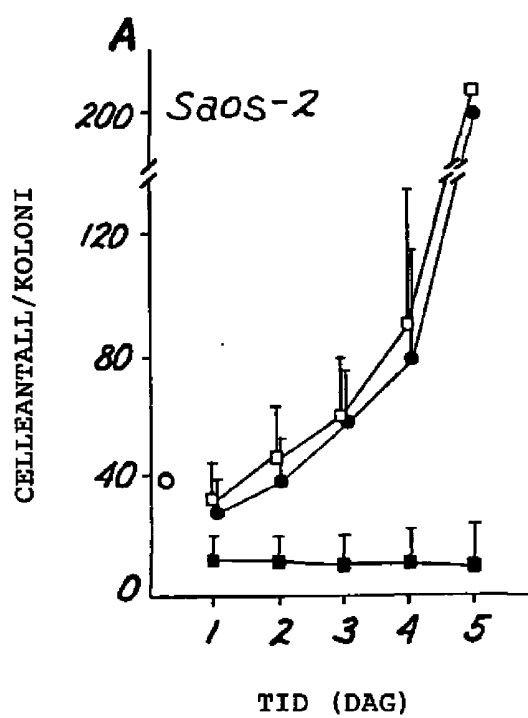


FIG. 4A

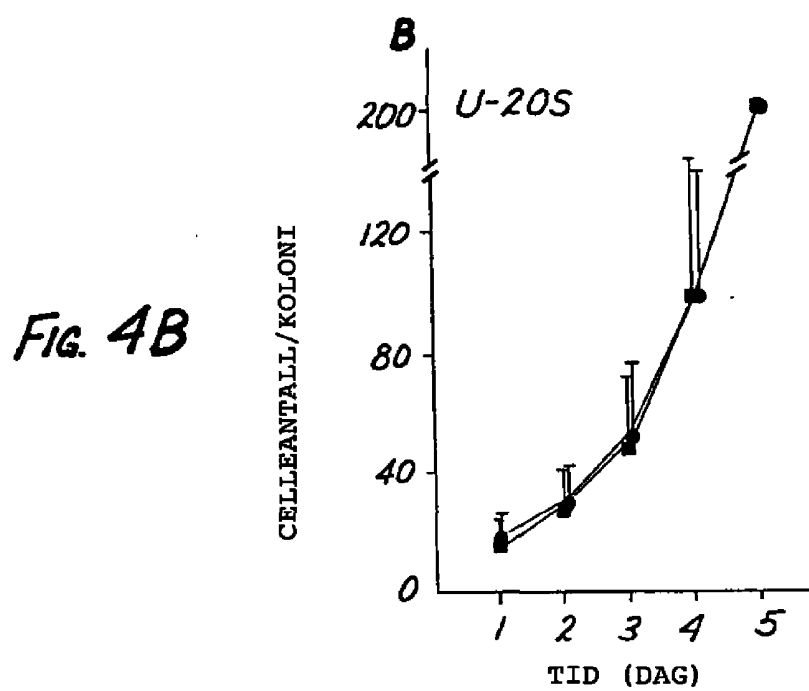


FIG. 4B



FIG. 5