



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 36 120 T2 2006.11.30**

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 863 984 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 696 36 120.5

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US96/19083

(96) Europäisches Aktenzeichen: 96 942 100.7

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1997/020047

(86) PCT-Anmeldetag: 27.11.1996

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 05.06.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 16.09.1998

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 10.05.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 30.11.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/12 (2006.01)**  
**A61K 48/00 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:

7810 P 30.11.1995 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

The Board of Regents, The University of Texas  
System, Austin, Tex., US

(72) Erfinder:

CLAYMAN, L., Gary, Houston, TX 77005, US

(74) Vertreter:

Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler  
Wichmann Huhn, 81675 München

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR BEHANDLUNG VON KREBS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

### HINTERGRUND DER ERFINDUNG

#### A. Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein das Gebiet der Krebsbiologie. Insbesondere betrifft die Erfindung Zusammensetzungen und Verfahren zur Behandlung des Plattenepithelkarzinoms. Auch ein Tiermodell zur Untersuchung von mikroskopischen Residualtumoren und Tumorkeimen in Körperhöhlen sowie Verfahren zu deren Behandlung werden bereitgestellt.

#### B. Verwandte Technik

**[0002]** Zur Aufrechterhaltung der normalen Gewebehomöostase sind ausgeglichene Geschwindigkeiten zwischen Zellproliferation und Zelltod wichtig. Eine Störung dieses Gleichgewichts kann ein bedeutender Faktor bei dem mehrstufigen Verfahren der Tumorgenese sein, und die Hemmung von Apoptose oder programmierter Zelltod ist ein Grund für diese Störung. Die Wirkungen von solchen Defekten sind katastrophal und sind der Grund für über eine halbe Million Todesfälle jährlich allein in den USA.

**[0003]** Es gibt starke Beweise für die Beteiligung von Mutationen des p53-Gens, ein Tumorsuppressor, an der Ätiologie von vielen menschlichen Krebserkrankungen. Berichte haben gezeigt, dass das Wachstum von mehreren verschiedenen menschlichen Krebszelllinien, einschließlich von Vertretern des Dickdarmkrebses, Glioblastoms, Brustkrebses, Osteosarkoms und Lungenkrebses funktionell durch einen Virus-vermittelten Transfer eines Wildtyp-p53-Gens unterdrückt werden kann. Die Induktion der exogenen p53-Expression von Wildtyp-p53 hat das Auslösen einer Apoptose in Darmkrebszelllinien und in menschlichen Lungenkrebszellen gezeigt, was eine Rolle von p53 beim programmierten Zelltod nahe legt.

**[0004]** Patienten mit Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinom (SCCHN) leiden an einer Erkrankung, die oft tiefgreifende Auswirkungen auf das Sprechen, Schlucken und auf die Kosmesis besitzt. Ferner bleibt die allgemeine Überlebensrate bei diesen Patienten, ungefähr 50%, schon seit nahezu 30 Jahren, seit die heutige operative und radiative Therapie entwickelt wurde, unverändert. Rekurrenzen sind überwiegend lokal und regional, im Gegensatz zu systemisch, was anzeigt, dass mikroskopische Residualkarzinome an der primären Tumorstelle die Hauptursache der Mortalität darstellen. Angesichts dieser Tatsachen ist die Fähigkeit der wirksamen Bekämpfung mikroskopischer Residualerkrankung bei SCCHN ein Bestreben, das die therapeutische Wirksamkeit von Krebsbehandlungen verbessern könnte. Beispielsweise offenbaren, Liu T.-J. et al. (1995), Cancer Research, 55, 3117-3122, die Induktion der Apoptose beim Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals durch einen Wildtyp-p53-Adenovirusgentransfer.

### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0005]** Darum ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Bereitstellung verbesserter Verfahren für die *in vivo* Behandlung des Plattenepithelkarzinoms. Ein Verfahren zur Bewertung der Entwicklung und Behandlung von mikroskopischen Residualkarzinomen und mikroskopischen Tumorkeimen von Körperhöhlen wird ebenfalls bereitgestellt.

**[0006]** Folglich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Expressionskonstrukts, insbesondere eines viralen Expressionskonstrukts, umfassend einen Promotor, der in eukaryotischen Zellen funktionell ist und ein Polynukleotid, das ein funktionelles p53-Polypeptid codiert, wobei das Polynukleotid sense zu und unter der Kontrolle des Promotors angeordnet ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines menschlichen Individuums mit einem soliden Tumor, wobei der Tumor Zellen umfasst, die ein funktionelles p53-Polypeptid exprimieren.

**[0007]** Bei der Erfüllung dieser Aufgaben wird ein Verfahren zur Behandlung eines Individuums mit einem Plattenepithelkarzinom bereitgestellt, umfassend die Schritte (a) Bereitstellen eines Expressionskonstrukts, umfassend einen Promotor, der in eukaryotischen Zellen funktionell ist, und eines Polynukleotids, das ein funktionelles p53-Polypeptid codiert, wobei das Polynukleotid sense zu und unter der Kontrolle des Promotors angeordnet ist; und (b) Kontaktieren des Expressionskonstrukts mit dem Plattenepithelkarzinom *in vivo*.

**[0008]** Das Plattenepithelkarzinom kann ein Kopf- und Halskarzinom sein. Das endogene p53 des Plattenepithelkarzinoms kann mutiert sein oder nicht. Das Expressionskonstrukt ist vorzugsweise ein viral Vektor, wie

ein retroviraler Vektor, ein adenoviraler Vektor und ein adenoassozierter viraler Vektor, wobei ein replikationsdefizienter adenoviraler Vektor besonders bevorzugt ist. Bei einer bestimmten Ausführungsform ist das p53-Gen markiert, so dass die Expression von p53 aus dem Expressionsvektor nachgewiesen werden kann. Eine bevorzugte Markierung ist eine immunologische Markierung, wie ein durchgehendes Antikörperepitop.

**[0009]** Das Verfahren kann die operative Resektion des Tumors umfassen, mit zusätzlichem Kontaktieren des Tumorbetts oder der "künstlichen Körperhöhle" mit dem Expressionskonstrukt nach der Resektion. Das zum Kontakt des Tumorbetts eingesetzte Volumen beträgt etwa 3 ml bis etwa 10 ml. Wo ein Adenovirusvektor eingesetzt ist, beträgt die verabreichte Menge an Adenovirus bei jedem Kontaktieren etwa  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  oder  $10^{12}$  PFU.

**[0010]** Auch die kontinuierliche Perfusion des Expressionskonstrukt wird in Betracht gezogen. Die Menge an Konstrukt, die bei der kontinuierlichen Perfusion abgegeben wird, wird aus der Menge bestimmt, die über Injektionen abgegeben wird, so dass die gleiche Gesamtdosis über einen gegebenen Zeitraum angenähert wird, obwohl etwas größere Gesamtdosen unter Anwendung der kontinuierlichen Perfusion erreicht werden können.

**[0011]** Bei einer weiteren Ausführungsform wird das Expressionskonstrukt in eine natürliche Körperhöhle, wie Mund, Pharynx, Ösophagus, Larynx, Trachea, Pleuralhöhle, Peritonealhöhle oder Hohlorgan-Höhlen, einschließlich Blase, Dickdarm oder andere viszerale Organe, injiziert.

**[0012]** Ebenfalls bereitgestellt wird ein Verfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit einer Therapie für mikroskopischen Residualkrebs, umfassend (a) Versorgen eines Nagetiers mit einer Inzision in subkutanes Gewebe; (b) Animpfen der Inzision mit Tumorzellen; (c) Behandeln des Nagetiers nach einem Therapieregime; und (d) Bewerten des Einflusses des Regimes auf die Entwicklung von Tumoren. Die Inzision kann nach Schritt (b) und vor Schritt (c) verschlossen werden. Außerdem kann das Regime das Einbringen einer therapeutischen Zusammensetzung in die Inzision umfassen, wobei die Inzision nach dem Verschließen wieder geöffnet und nach dem Einbringen der therapeutischen Zusammensetzung wieder verschlossen wird.

**[0013]** Weitere Aufgaben, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung gehen aus der folgenden ausführlichen Beschreibung hervor. Selbstverständlich sollten allerdings die ausführliche Beschreibung und die speziellen Beispiele bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung angeben.

#### KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0014]** Die folgenden Zeichnungen bilden einen Teil der vorliegenden Spezifikation und sind zur weiteren Erläuterung bestimmter Aspekte der vorliegenden Erfindung eingeschlossen. Die Erfindung kann unter Bezugnahme auf eine oder mehrere von diesen Zeichnungen zusammen mit der hier dargestellten ausführlichen Beschreibung der speziellen Ausführungsformen besser verstanden werden:

**[0015]** [Fig. 1](#). Transduktionswirksamkeit der SCCHN-Zelllinien Tu-138 (ausgefüllte Dreiecke) und Tu-177 (ausgefüllte Quadrate). Ein rekombinantes  $\beta$ -gal-Adenovirus wurde zur Infizierung der Zellen bei verschiedenen MOI im Bereich von 10 bis 100 verwendet. Die Prozente an  $\beta$ -gal-positiven Zellen wurden durch die Auswertung von jeweils 500 Zellen aus replizierten Schalen erhalten.

**[0016]** [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#). Hemmung des SCCHN-Zellwachstums in vitro. ([Fig. 2A](#)) Wachstumskurve von mock-infizierten Tu-138-Zellen (geschlossene Kreise), dl312-infizierten Zellen (ausgefüllte Dreiecke) und Ad5CMV-p53-infizierten Zellen (ausgefüllte Quadrate). ([Fig. 2B](#)) Wachstumskurve von mock-infizierten Tu-177-Zellen (nicht ausgefüllte Kreise), dl312-infizierten Zellen (nicht ausgefüllte Dreiecke) und Ad5CMV-p53-infizierten Zellen (nicht ausgefüllte Quadrate). Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurden drei Schalen mit Zellen trypsinisiert und gezählt. Der Mittelwert  $\pm$  SEM der Zellzählungen pro drei Vertiefungen nach der Infektion wurde gegen die Anzahl von Tagen nach der Infektion aufgetragen.

**[0017]** [Fig. 3A](#), [Fig. 3B](#), [Fig. 3C](#) und [Fig. 3D](#). Zusammengefasste Wachstumskurven von vier SCCHN-Zelllinien. ([Fig. 3A](#)) Tu-138. ([Fig. 3B](#)) Tu-177. ([Fig. 3C](#)) MDA 686-LN. ([Fig. 3D](#)) MDA 886. Mock-infizierte Zellen (ausgefüllte Kreise), dl312-infizierte Zellen (ausgefüllte Dreiecke) und Ad5CMV-p53-infizierte Zellen (ausgefüllte Quadrate). Der Mittelwert der Zellzählungen pro drei Vertiefungen nach der Infektion wurde gegen die Anzahl von Tagen nach der Infektion aufgetragen; Balken, SEM.

**[0018]** [Fig. 4](#). Wachstumskurve einer normalen Fibroblastenzelllinie. Mock-infizierte Zellen (ausgefüllte Kreise), dl312-infizierte Zellen (ausgefüllte Dreiecke) und Ad5CMV-p53-infizierte Zellen (ausgefüllte Quadrate).

**[0019]** [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#) Zusammengefasste Wachstumskurven von SCCHN-Zelllinien. [Fig. 5A](#): Tu-138; [Fig. 5B](#): MDA 686LN; Mock-infizierte Zellen (nicht ausgefülltes Quadrat), dl312-infizierte Zellen (nicht ausgefülltes Dreieck) und Ad5CMV-p53-infizierte Zellen (nicht ausgefüllter Kreis). Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurden drei Schalen mit Zellen trypsinisiert und gezählt. Der Mittelwert der Zellzählungen pro drei Schalen wurde gegen die Anzahl von Stunden nach der Infektion aufgetragen; Balken, SEM.

**[0020]** [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#). Markierung von DNA-Brüchen in apoptotischen Zellen mit biotinyliertem dUTP durch das TUNEL-Verfahren. Nach der Infektion wurde in einer zeitabhängigen Studie eine Flusszytometrie-Analyse der Apoptose durchgeführt. [Fig. 6A](#): Tu-138-Zellen, die mit dl312, ein replikationsdefektes Adenovirus, infiziert sind (Tafel 1–Tafel 4), Tu-138-Zellen, die mit dem Wildtyp-p53-Adenovirus infiziert sind (Tafel 5–Tafel 8). [Fig. 6B](#): MDA-686LN-Zellen, die mit dl312, ein replikationsdefektes Adenovirus, infiziert sind (A–D), MDA-686LN-Zellen, die mit dem Wildtyp-p53-Adenovirus (E–H) infiziert sind. Ap steht für Apoptose.

**[0021]** [Fig. 7A](#) und [Fig. 7B](#). Zusammengefasste Wachstumskurven der SCCHN-Zelllinie. [Fig. 7A](#): Tu-138; [Fig. 7B](#): MD 686LN; Mock-infizierte Zellen (nicht ausgefüllte Kreise), dl312-infizierte Zellen (geschlossene Dreiecke), Ad5CMV-p53-infizierte Zellen (nicht ausgefüllte Quadrate) und Ad5CMV-p53-FLAG-infizierte Zellen (ausgefüllte Quadrate). Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurden drei Schalen von Zellen trypsinisiert und gezählt. Der Mittelwert der Zellzählungen pro drei Schalen wurde gegen die Anzahl von Stunden nach der Infektion aufgetragen; Balken, SEM.

#### AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER BEVORZUTGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

**[0022]** Die bisher verfügbare Information legt nahe, dass einer der Hauptnachteile der Behandlungen für SCCHN das Unvermögen ist, die Erkrankung an der primären Tumorzelle oder in den unmittelbar lokalen oder regionalen Geweben vollständig zu beseitigen. Darum ist die vorliegende Erfindung dazu ausgelegt, gentherapeutische Methoden bereitzustellen, die eine vollständigere und wirksamere Behandlung von SCCHN erlaubt, insbesondere durch die Bekämpfung von mikroskopischen Residualkarzinomen. Diese Methode kann allein oder zusätzlich zu den gängigeren Behandlungen, wie Chemo- oder Radiotherapie oder chirurgischer Eingriff, angewandt werden. Ferner haben die vorliegenden Erfinder unter Anwendung eines tierischen Modells, das insbesondere dazu ausgelegt ist, das mikroskopische Residualkarzinom sowie mikroskopische Tumorkerne in Körperhöhlen anzugehen, die Wirksamkeit dieser Methoden gezeigt. Die Einzelheiten der Erfindung sind nachstehend vollständiger beschrieben.

**[0023]** Allgemeiner wurde nun festgestellt, dass die p53-Gentherapie von Krebserkrankungen wirksam sein kann, ohne Rücksicht auf den p53-Status der Tumorzelle. Überraschenderweise wurden therapeutische Wirkungen festgestellt, wenn ein viraler Vektor, der das Wildtyp-p53-Gen trägt, zur Behandlung eines Tumors verwendet wird, dessen Zellen ein funktionelles p53-Molekül exprimieren. Dieses Ergebnis würde auf der Grundlage des derzeitigen Verständnisses darüber, wie Tumorsuppressoren funktionieren, nicht vorhergesagt werden. Überraschend ist auch, dass normale Zellen, die ebenfalls ein funktionelles p53-Molekül exprimieren, offensichtlich von der Expression hoher Niveaus von p53 aus einem viralen Konstrukt unbeeinflusst sind. Dies lässt die Möglichkeit entstehen, dass eine p53-Gentherapie bei der Behandlung von Krebserkrankungen breiter anwendbar ist, als ursprünglich vermutet.

##### A. p53-Proteine und Polynucleotide

**[0024]** In der Anmeldung soll sich der Begriff "p53" auf die beispielhaft dargestellten p53-Moleküle sowie auf sämtliche p53-Homologe aus anderen Spezies beziehen. "Wildtyp-" bzw. "mutiertes" p53 bezieht sich auf ein p53-Gen, das eine normale Tumorsuppressoraktivität exprimiert und auf ein p53-Gen mit mangelnder oder reduzierter Suppressoraktivität und/oder Transformationsaktivität. Somit sind "mutierte" p53 nicht bloß Sequenzvarianten, sondern eher diejenigen Varianten, die veränderte Funktionsprofile aufweisen.

**[0025]** p53 ist derzeit als Tumorsuppressoren anerkannt (Montenarh, 1992). Hohe Niveaus wurden in vielen Zellen festgestellt, die durch chemische Karzinogenese, UV-Strahlung und mehreren Viren, einschließlich SV40, transformiert wurden. Das p53-Gen ist ein häufiges Ziel einer Mutations-Inaktivierung in einem breiten Bereich von menschlichen Tumoren und ist bereits als das am häufigsten mutierte Gen bei allgemeinen menschlichen Krebserkrankungen dokumentiert (Mercer, 1992). Es ist in über 50% des menschlichen NSCLC (Hollestein et al., 1991) und in einem breiten Spektrum von anderen Tumoren mutiert.

**[0026]** Obgleich Tumore, die ein mutiertes p53-Gen enthalten, ein bevorzugtes Ziel sind, erweitert sich die Brauchbarkeit der beanspruchten p53-Expressionsvektoren auf die Behandlung von Tumoren mit Wildtyp-

oder funktionellem p53. Obwohl der Mechanismus nicht vollständig verstanden wird, hat der vorliegende Erfinder festgestellt, dass die p53-Expression das Wachstum von Tumoren, die ein funktionelles p53-Produkt exprimieren, einschränken und auch die Apoptose in solchen Zellen auslösen kann. Somit ist der p53-Status eines Tumors, obwohl in einem diagnostischen Zusammenhang potentiell geeignet, für die Praxis der vorliegenden Erfindung nicht essentiell. Dieses Phänomen ist nicht auf SCCHN-Tumore beschränkt, sondern trifft auf eine breite Vielzahl von Malignitäten zu, einschließlich Gliome, Sarkome, Karzinome, Leukämien, Lymphome und Melanome, einschließlich Tumore von Haut, Leber, Hoden, Knochen, Gehirn, Pankreas, Kopf und Hals, Magen, Leber, Lunge, Eierstock, Brust, Darm, Prostata und Blase.

#### p53-Polypeptide

**[0027]** Das p53-Gen codiert ein 375-Aminosäurephosphorprotein, das Komplexe mit Virusproteinen bilden kann, wie das große T-Antigen und E1B. Das Protein wird in normalen Geweben und Zellen gefunden, allerdings in Konzentrationen, die im Vergleich mit vielen transformierten Zellen oder mit Tumorgewebe winzig sind. Interessanterweise ist Wildtyp-p53 offenbar bei der Regulierung des Zellwachstums und der Zellteilung von Bedeutung. Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von Wildtyp-p53 in einigen Fällen in menschlichen Tumorzelllinien proliferationshemmend ist. Somit kann p53 als negativer Regulator des Zellwachstums wirken (Weinberg, 1991) und kann ein unkontrolliertes Zellwachstum direkt unterdrücken oder indirekt Gene aktivieren, die dieses Wachstum unterdrücken. Somit kann die Abwesenheit oder Inaktivierung von Wildtyp-p53 zur Transformation beitragen. Allerdings zeigen einige Studien, dass die Gegenwart von mutiertem p53 zur vollständigen Expression des Transformationspotentials des Gens notwendig sein kann.

**[0028]** Obwohl Wildtyp-p53 bei vielen Zelltypen als ein Wachstumsregulator von zentraler Bedeutung anerkannt ist, scheinen auch seine genetischen und biochemischen Merkmale eine Rolle zu spielen. Missense-Mutationen sind für das p53-Gen üblich und sind für die Transformationsfähigkeit des Onkogens essentiell. Eine einzige genetische Änderung, die von einer Punktmutation hervorgebracht wird, kann karzinogenes p53 erzeugen. Im Gegensatz zu anderen Onkogenen treten allerdings p53-Punktmutationen bekanntlich in mindestens 30 distinkten Codons auf und erzeugen oft dominante Allele, die Verschiebungen im Zellphänotyp ohne eine Herabsetzung der Homozygotität erzeugen. Zusätzlich sind anscheinend viele dieser dominanten negativen Allele im Organismus toleriert und gehen in die Keimbahn über. Verschiedene mutierte Allele reichen anscheinend von minimal dysfunktionalen bis stark penetranten, dominanten negativen Allelen (Weinberg, 1991).

**[0029]** Casey und Kollegen haben berichtet, dass die Transfektion von DNA, die Wildtyp-p53 codiert, in zwei menschlichen Brustkrebs-Zelllinien die Wachstumssuppressionskontrolle in solchen Fällen wiederherstellt (Casey et al. 1991). Eine ähnliche Wirkung wurde auch bei der Transfektion von Wildtyp-, allerdings nicht bei mutiertem p53 in menschliche Lungenkrebs-Zelllinien gezeigt (Takahasi et al, 1992). Der p53-Wildtyp dominiert anscheinend gegenüber dem mutierten Gen und wird gegenüber der Proliferation bei Transfektion in Zellen mit dem mutierten Gen selektiert. Die Expression des transfizierten p53 beeinflusst das Wachstum von normalen Zellen mit endogenem p53 nicht. Somit könnten solche Konstrukte von normalen Zellen ohne beeinträchtigende Wirkungen aufgenommen werden.

**[0030]** Es ist somit möglich, dass die Behandlung der mit p53 zusammenhängenden Krebserkrankungen mit Wildtyp-p53 die Anzahl von malignen Zellen reduzieren kann. Allerdings sind Studien, wie diejenigen, die vorstehend beschrieben sind, weit davon entfernt, ein solches Ziel zu erreichen, nicht minder deswegen, da die DNA-Transfektion nicht eingesetzt werden kann, um DNA in Krebszellen innerhalb eines Patientenkörpers einzubringen.

#### p53-codierende Polynucleotide

**[0031]** Die erfindungsgemäßen Polynucleotide können ein gesamtes p53-Gen, eine funktionelle p53-Protein-domäne oder jedes p53-Polypeptid codieren. "Komplementäre" Polynucleotide sind diejenigen, die zur Basenpaarung gemäß den Standard-Watson-Crick-Komplementaritätsregeln in der Lage sind. Das heißt, die größeren Purine gehen eine Basenpaarung mit den kleineren Pyrimidinen unter Bildung von Kombinationen von Guanin, gepaart mit Cytosin (G:C) und Adenin, gepaart entweder mit Thymin (A:T), im Falle von DNA, oder Adenin, gepaart mit Uracil (A:U), im Falle von RNA ein. Der Einschluss von weniger üblichen Basen, wie Inosin, 5-Methylcytosin, 6-Methyladenin, Hypoxanthin und anderen in hybridisierende Sequenzen, beeinflusst die Paarung nicht.

**[0032]** Wir hier verwendet, bedeutet der Begriff "komplementäre Sequenzen" Polynucleotidsequenzen, die im Wesentlichen über ihre gesamte Länge komplementär sind und sehr wenige Basenfehlpaarungen aufweisen.

Beispielsweise können Sequenzen, die 15 Basen lang sind, als komplementär bezeichnet werden, wenn sie an 13 oder 14 Positionen ein komplementäres Nucleotid aufweisen. Naturgemäß sind Sequenzen, die "vollständig komplementär" sind, Sequenzen, die über ihre gesamte Länge vollständig komplementär sind und keine Basenfehlpaarungen aufweisen.

**[0033]** Auch andere Sequenzen mit niedrigeren Homologiegraden werden betrachtet. Beispielsweise könnte ein Antisense-Konstrukt, das begrenzte Regionen mit hoher Homologie aufweist, jedoch auch eine nicht-homologe Region enthält (z.B. ein Ribozym), konstruiert werden. Diese Moleküle, obwohl sie weniger als 50% Homologie aufweisen, würden unter den geeigneten Bedingungen an Zielsequenzen binden.

**[0034]** Die Polynucleotide können von genomischer DNA, d. h. direkt aus dem Genom eines bestimmten Organismus kloniert, stammen. Bei anderen Ausführungsformen können die Polynucleotide allerdings komplementäre DNA (cDNA) sein. cDNA ist DNA, die unter Verwendung von Messenger-RNA (mRNA) als Templat hergestellt wurde. Somit enthält eine cDNA keine unterbrochenen codierenden Sequenzen und enthält im Allgemeinen fast ausschließlich die codierende(n) Region(en) für das entsprechende Protein. Bei anderen Ausführungsformen kann das Polynucleotid synthetisch hergestellt werden.

**[0035]** Es kann zweckmäßig sein, Teile der genomischen DNA mit cDNA oder synthetischen Sequenzen zur Generierung spezieller Konstrukte zu kombinieren. Wo beispielsweise ein Intron in dem Endkonstrukt erwünscht ist, muss ein genomischer Klon verwendet werden. Introns können sich, zusätzlich zu p53, von anderen Genen ableiten. Die cDNA oder ein synthetisiertes Polynucleotid kann mehrere zweckmäßige Restriktionschnittstellen für den restlichen Teil des Konstrukts bereitstellen und würde darum für den Rest der Sequenz verwendet werden.

**[0036]** Die menschliche bzw. Maus-DNA-Sequenz für p53 ist in SEQ ID NO: 1 bzw. SEQ ID NO: 3 bereitgestellt, wobei die entsprechenden Aminosäuren in SEQ ID NO: 2 bzw. SEQ ID NO: 4 bereitgestellt sind.

**[0037]** Es wird davon ausgegangen, dass natürliche Varianten von p53 existieren, die andersartige Sequenzen aufweisen als diejenigen, die hier offenbart sind. Somit ist die vorliegende Erfindung nicht auf die Verwendung der bereitgestellten Polynucleotidsequenz für p53 beschränkt, sondern umfasst vielmehr die Verwendung von beliebigen natürlich vorkommenden Varianten. Die vorliegende Erfindung umfasst auch die Verwendung von chemisch synthetisierten Mutanten dieser Sequenzen.

**[0038]** Eine weitere Art von Sequenzvariante ergibt sich aus einer Codonvariation. Da für die meisten der 20 normalen Aminosäuren mehrere Codons existieren, können viele verschiedene DNAs das p53 codieren. Unter Bezugnahme auf die folgende Tabelle lassen sich solche Varianten identifizieren.

TABELLE 1

Aminosäuren	Codons					
Alanin	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU
Cystein	Cys	C	UGC	UGU		
Asparaginsäure	Asp	D	GAC	GAU		
Glutaminsäure	Glu	E	GAA	GAG		
Phenylalanin	Phe	F	UUC	UUU		
Glycin	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU
Histidin	His	H	CAC	CAU		

Isoleucin	Ile	I	AUA	AUC	AUU				
Lysin	Lys	K	AAA	AAG					
Leucin	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
Methionin	Met	M	AUG						
Asparagin	Asn	N	AAC	AAU					
Prolin	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
Glutamin	Gln	Q	CAA	CAG					
Arginin	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
Serin	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
Threonin	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
Valin	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			
Tryptophan	Trp	W	UGG						
Tyrosin	Tyr	Y	UAC	UAU					

**[0039]** In Anbetracht der Regenerierung des genetischen Codes sind Sequenzen bevorzugt, die zu etwa 50% bis etwa 75% oder zu etwa 76% bis etwa 99% Nucleotide aufweisen, die mit den hier offenbarten Nucleotiden identisch sind. Sequenzen, die im Umfang "eines p53-codierenden Polynucleotids" liegen, sind diejenigen, die zur Basenpaarung mit einem vorstehend aufgeführten Polynucleotidsegment unter intrazellulären Bedingungen in der Lage sind.

**[0040]** Wie vorstehend ausgeführt, können die p53-codierenden Sequenzen jedoch Vollängengenom- oder cDNA-Kopien oder große Fragmente davon sein. Die vorliegende Erfindung kann auch kürzere Oligonucleotide von p53 einsetzen. Sequenzen mit der Basenlänge 17 sollten nur einmal im menschlichen Genom vorkommen und darum ausreichen, um eine einzige Zielsequenz zu spezifizieren. Obwohl kürzere Oligomere leichter herzustellen sind und die in vivo Zugänglichkeit erhöhen, sind zahlreiche andere Faktoren an der Festlegung der Spezifität der Basenpaarung beteiligt. Sowohl die Bindungsaffinität als auch die Sequenzspezifität eines Oligonucleotids gegenüber seinem komplementären Ziel erhöhen sich mit zunehmender Länge. Es wird davon ausgegangen, dass Oligonucleotide mit 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 oder 20 Basenpaaren verwendet werden, beispielsweise bei der Herstellung von p53-Mutanten und bei PCR-Reaktionen.

**[0041]** Jede Sequenz mit der Basenlänge 17 sollte nur einmal im menschlichen Genom auftreten und darum ausreichen, um eine einzige Zielsequenz festzulegen. Obwohl kürzere Oligomere leichter herzustellen sind und die in vivo Verfügbarkeit erhöhen, sind zahlreiche andere Faktoren an der Bestimmung der Hybridisierungsspezifität beteiligt. Sowohl die Bindungsaffinität als auch die Sequenzspezifität eines Oligonucleotids gegenüber seinem komplementären Ziel erhöhen sich mit zunehmender Länge.

**[0042]** Bei bestimmten Ausführungsformen kann es gewünscht sein, Konstrukte einzusetzen, die andere Elemente einschließen, beispielsweise diejenigen, die C-5-Propinpyrimidine umfassen. Es hat sich gezeigt, dass Oligonucleotide, die C-5-Propinanaloge von Uridin und Cytidin enthalten, RNA mit hoher Affinität binden (Wagner et al., 1993).

**[0043]** Es wird vom Fachmann auch gut verstanden, dass, der Definition eines biologisch funktionellen äquivalenten Proteins oder Peptids inhärent, das folgende Konzept ist, dass es für die Anzahl von Änderungen, die innerhalb eines bestimmten Teils des Moleküls vorgenommen werden können und immer noch ein Molekül mit annehmbarem Niveau von äquivalenter biologischer Aktivität ergeben, ein Limit gibt. Biologisch funktionelle äquivalente Peptide sind somit hier als diejenigen Peptide definiert, in denen bestimmte, nicht die meisten oder alle, Aminosäuren substituiert sein können. Insbesondere, wenn der N-Terminus des p16-Proteins betroffen ist, wird davon ausgegangen, dass nur etwa 16 oder mehr bevorzugt etwa 5 Aminosäuren innerhalb eines gegebenen Peptids geändert werden können. Natürlich kann eine Vielzahl von distinkten Proteinen-Peptiden mit bestimmten Substitutionen leicht hergestellt und erfindungsgemäß eingesetzt werden.

**[0044]** Aminosäure-Substitutionen beruhen im Allgemeinen auf der relativen Ähnlichkeit der Aminosäure-Seitenkette-Substituenten, beispielsweise auf ihrer Hydrophobie, Hydrophilie, Ladung, Größe und dergleichen. Eine Analyse der Größe, Form und des Typs der Aminosäure-Seitenkette-Substituenten ergibt, dass Arginin, Lysin und Histidin alle positiv geladene Reste sind; dass Alanin, Glycin und Serin alle eine ähnliche Größe aufweisen und dass Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin alle eine im Allgemeinen ähnliche Form aufweisen. Darauf werden hier auf der Grundlage dieser Überlegungen Arginin, Lysin und Histidin; Alanin, Glycin und Serin und Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin; als biologisch funktionelle Äquivalente definiert.

**[0045]** Bei der Vornahme von Änderungen kann der hydropathische Index von Aminosäuren berücksichtigt werden. Jeder Aminosäure wurde auf der Grundlage ihrer Hydrophobie- und Ladungsmerkmale ein hydropathischer Index zugeordnet, diese sind: Isoleucin (+4,5); Valin (+4,2); Leucin (+3,8); Phenylalanin (+2,8); Cystein/Cystin (+2,5); Methionin (+1,9); Alanin (+1,8); Glycin (-0,4); Threonin (-0,7); Serin (-0,8); Tryptophan (-0,9); Tyrosin (-1,3); Prolin (-1,6); Histidin (-3,2); Glutamat (-3,5); Glutamin (-3,5); Aspartat (-3,5); Asparagin (-3,5); Lysin (-3,9); und Arginin (-4,5).

**[0046]** Die Bedeutung des hydropathischen Aminosäureindex bei der Übertragung von interaktiver biologischer Funktion auf ein Protein wird in der Technik im Allgemeinen verstanden (Kyte & Doolittle, 1982). Es ist bekannt, dass bestimmte Aminosäuren gegen andere Aminosäuren mit einem ähnlichen hydropathischen Index oder einer ähnlichen Bewertung ausgetauscht werden können und immer noch eine ähnliche biologische Aktivität beibehalten. Bei der Vornahme von Änderungen auf der Grundlage des hydropathischen Index ist die Substitution von Aminosäuren, deren hydropathischer Index innerhalb von  $\pm 2$  liegt, bevorzugt, die Substitution derjenigen, die innerhalb von  $\pm 1$  liegen, ist besonders bevorzugt, und die Substitution derjenigen, die innerhalb von  $\pm 0,5$  liegen, ist sogar noch stärker bevorzugt.

**[0047]** Es ist selbstverständlich, dass eine Aminosäure gegen eine andere mit einem ähnlichen Hydrophiliewert ersetzt werden kann und immer noch ein biologisch äquivalentes Protein erhalten wird. Wie in der US-Patentschrift 4,554,101 ausgeführt, wurden den Aminosäureresten die folgenden Hydrophiliewerte zugeordnet: Arginin (+3,0); Lysin (+3,0); Aspartat (+3,0  $\pm$  1); Glutamat (+3,0  $\pm$  1); Serin (+0,3); Asparagin (+0,2); Glutamin (+0,2); Glycin (0); Threonin (-0,4); Prolin (-0,5  $\pm$  1); Alanin (-0,5); Histidin (-0,5); Cystein (-1,0); Methionin (-1,3); Valin (-1,5); Leucin (-1,8); Isoleucin (-1,8); Tyrosin (-2,3); Phenylalanin (-2,5); Tryptophan (-3,4).

**[0048]** Bei der Vornahme von Änderungen auf der Grundlage ähnlicher Hydrophiliewerte ist die Substitution von Aminosäuren, deren Hydrophiliewert innerhalb von  $\pm 2$  liegt, bevorzugt, die Substitution derjenigen, die innerhalb von  $\pm 1$  liegen, ist besonders bevorzugt, und die Substitution derjenigen, die innerhalb von  $\pm 0,5$  liegen, ist sogar noch stärker bevorzugt.

## B. Expressionsvektoren

**[0049]** In dieser Anmeldung soll der Begriff "Expressionskonstrukt" jeden Typ von genetischem Konstrukt einschließen, das eine Nucleinsäure enthält, die ein Genprodukt codiert, in dem ein Teil oder alles der Nucleinsäure-codierenden Sequenz in der Lage ist, transkribiert zu werden. Das Transkript kann, muss aber nicht, in ein Protein translatiert werden. Somit umfasst bei bestimmten Ausführungsformen die Expression sowohl die Transkription eines p53-Gens als auch die Translation einer p53-mRNA in ein p53-Proteinprodukt. Bei anderen Ausführungsformen umfasst die Expression nur die Transkription der Nucleinsäure, die ein p53 oder sein Komplement codiert.

**[0050]** Damit das Konstrukt die Expression von mindestens einem p53-Transkript bewirkt, steht das Polynucleotid, das das p53-Polynucleotid codiert, unter der transkriptionalen Kontrolle eines Promotors. Ein "Promotor" bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, die von der Synthesemaschinerie der Wirtszelle erkannt oder die in die Synthesemaschinerie eingeschleust wird, d. h. die erforderlich ist, um die spezifische Transkription eines Gens zu starten. Der Begriff "unter transkriptionaler Kontrolle" bedeutet, dass sich der Promotor in Relation zu dem Polynucleotid an der richtigen Stelle befindet, um die Initiation der RNA-Polymerase und die Expression des Polynucleotids zu kontrollieren.

**[0051]** Der Begriff Promotor wird hier verwendet, um eine Gruppe von transkriptionalen Kontrollmodulen zu bezeichnen, die um die Initiationsstelle für die RNA-Polymerase II geclustert sind. Ein großer Teil der Erkenntnis darüber, wie Promotoren organisiert sind, stammt von Analysen von mehreren viralen Promotoren, einschließlich derjenigen für die HSV-Thymidinkinase (TK) und den frühen Transkriptionseinheiten von SV40 ab. Diese Studien, erweitert durch neuere Arbeiten, haben gezeigt, dass Promotoren aus diskreten Funktionsmo-

dulen bestehen, die jeweils aus ungefähr 7–20 bp DNA bestehen und eine oder mehrere Erkennungsstellen für transkriptionale Aktivator- oder Repressorproteine enthalten.

**[0052]** Mindestens ein Modul in jedem Promotor funktioniert zur Positionierung der Startstelle für die RNA-Synthese. Das am besten bekannte Beispiel hierfür ist die TATA-Box, aber bei einigen Promotoren, bei denen eine TATA-Box fehlt, wie bei dem Promotor für das terminale Deoxynucleotidyltransferase-Gen von Säugern und bei dem Promotor für die späten Gene von SV40, trägt ein diskretes Element, das über der Startstelle als solches liegt, dazu bei, die Initiationssstelle zu fixieren.

**[0053]** Zusätzliche Promotorelemente regulieren die Frequenz des Transkriptionsstarts. Typischerweise sind diese in der Region 30–110 bp stromaufwärts von der Startstelle angeordnet, obwohl gezeigt wurde, dass eine Anzahl von Promotoren auch funktionelle Elemente stromabwärts der Startstelle enthält. Der Abstand zwischen den Promotorelementen ist häufig flexible, so dass die Promotorfunktion konserviert wird, wenn Elemente invertiert oder relativ zueinander bewegt werden. In dem TK-Promotor kann der Abstand zwischen Promotorelementen auf einen Abstand von 50 bp erhöht werden, bevor die Aktivität abzufallen beginnt. In Abhängigkeit von dem Promotor scheint es, dass einzelne Elemente entweder kooperativ oder unabhängig zur Aktivierung der Transkription funktionieren können.

**[0054]** Der bestimmte Promotor, der zur Kontrolle der Expression eines p53-Polynucleotids eingesetzt wird, wird nicht als kritisch betrachtet, solange er in der Lage ist, das Polynucleotid in der Zielzelle auf ausreichenden Niveaus zu exprimieren. Wo somit eine menschliche Zelle das Ziel ist, ist es bevorzugt, die Polynucleotid-co-dierende Region im Anschluss an und unter der Kontrolle von einem Promotor anzugeordnen, der in der Lage ist, in einer menschlichen Zelle exprimiert zu werden. Allgemein ausgedrückt, könnte ein solcher Promotor entweder einen menschlichen oder viralen Promotor einschließen.

**[0055]** Bei verschiedenen Ausführungsformen kann der sehr frühe Genpromotor des menschlichen Cytomegalovirus (CMV), der frühe SV40-Promotor und die lange terminale Wiederholungssequenz des Rous-Sarkom-Virus zum Erhalt einer Expression auf hohem Niveau des p53-Polynucleotids verwendet werden. Die Verwendung von anderen viralen oder zellulären Säuger- oder Bakterien-Phage-Promotoren, die aus der Technik gut bekannt sind, um die Expression von Polynucleotiden zu erreichen, wird ebenfalls in Betracht gezogen, mit der Maßgabe, dass die Expressionsniveaus ausreichen, um einen wachstumsinhibitorischen Effekt hervorzurufen.

**[0056]** Durch Einsatz eines Promotors mit gut bekannten Eigenschaften kann das Niveau und das Raster der Expression eines Polynucleotids nach der Transfektion optimiert werden. Beispielsweise gestattet die Selektion eines Promotors, der in spezifischen Zellen aktiv ist, wie Tyrosinase (Melanom), alpha-Fetoprotein- und Albulin- (Leberumore), CC10-(Lungentumor) und Prostata-spezifisches Antigen (Prostatatumor), eine Gewebe-spezifische Expression von p53-Polynucleotiden. Tabelle 2 listet mehrere Elemente/Promotoren, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können, um die Expression von p53-Konstrukten zu regulieren. Die Liste soll für alle möglichen Elemente, die an der Beschleunigung der p53-Expression beteiligt sind, nicht erschöpfend, sondern nur beispielhaft dafür sein.

**[0057]** Enhancer wurden ursprünglich als genetische Elemente nachgewiesen, die die Transkription von einem Promotor, der an einer distinkten Stelle auf demselben DNA-Molekül angeordnet ist, erhöhen. Diese Fähigkeit, über einen langen Abstand zu wirken, hatte bei den klassischen Untersuchungen der prokaryotischen transkriptionalen Regulierung wenig Beispiele. Spätere Arbeiten zeigten, dass DNA-Regionen mit Enhanceraktivität sehr wie Promotoren organisiert sind. D. h. sie bestehen aus vielen einzelnen Elementen, die jeweils an ein oder mehrere transkriptionale Proteine binden.

**[0058]** Die grundlegende Unterscheidung zwischen Enhancern und Promotoren ist operativ. Eine Enhancerregion als Ganze muss in der Lage sein, die Transkription aus einer Entfernung zu stimulieren; dies muss nicht auf eine Promotorregion oder seine Komponentenelemente zutreffen. Andererseits muss ein Promotor ein oder mehrere Elemente aufweisen, die den Start der RNA-Synthese an einer bestimmten Stelle und in einer bestimmten Orientierung steuern, wohingegen Enhancern diese Spezifitäten fehlen. Promotoren und Enhancer sind oft überlappend und zusammenhängend und scheinen oft eine sehr ähnliche modulare Organisation aufzuweisen.

**[0059]** Zusätzlich könnte jede Promotor/Enhancerkombination (wie die Eukaryotische Promotordatenbasis EPDB) ebenfalls zum Antrieben der Expression eines p53-Konstrukts eingesetzt werden. Die Verwendung eines T3-, T7- oder SP6-zytoplasmatischen Expressionssystems ist eine weitere mögliche Ausführungsform.

Eukaryotische Zellen können die zytoplasmatische Transkription von bestimmten Bakteriophage-Promotoren aus unterstützen, wenn die entsprechende Bakteriophage-Polymerase bereitgestellt wird, entweder als Teil des Abgabekomplexes oder als zusätzlicher genetischer Expressionsvektor.

TABELLE 2

ENHANCER
schwere Kette des Immunglobulins
leichte Kette des Immunglobulins
T-Zellenrezeptor
HLA DQ $\alpha$ und DQ $\beta$
$\beta$ -Interferon
Interleukin-2
Interleukin-2-Rezeptor
MHC Klasse II 5
MHC Klasse II HLA-DR $\alpha$

**β-Actin**  
**Muskelkreatinkinase**  
**Prealbumin (Transthyretin)**  
**Elastase I**  
**Metallothionein**  
**Kollagenase**  
**Albumin-Gen**  
**α-Fetoprotein**  
**τ-Globin**  
**β-Globin**  
**c-fos**  
**c-HA-ras**  
**Insulin**  
**Neuralzellen-Adhäsionsmolekül (NCAM)**  
**α<sub>1</sub>-Antitrypsin**  
**H2B (TH2B) Histon**  
**Maus- oder Typ-I-Kollagen**  
**Glucose-regulierte Proteine (GRP94 und GRP78)**  
**Ratten-Wachstumshormon**  
**Humanserum-Amyloid A (SAA)**  
**Troponin I (TN I)**

Tabelle 2 (Fortsetzung)

<b>ENHANCER</b>
Plättchen-abhängiger Wachstumsfaktor
Duchenne-Muskeldystrophie
SV40
Polyoma

Retrovirus  
 Papillomavirus  
 Hepatitis-B-Virus  
 Humanimmundefizienzvirus  
 Cytomegalovirus  
 Gibbonaffen-Leukämievirus

**[0060]** Weiterhin kann die Selektion eines Promotors, der durch die Reaktion auf spezifische physiologische Signale reguliert wird, die induzierbare Expression des p53-Konstrukts ermöglichen. Beispielsweise ist die Expression, bei der das Polynukleotid unter der Kontrolle des menschlichen PAI-1-Promotors steht, durch den Tumornekrosefaktor induzierbar. Tabelle 3 erläutert mehrere Promotor-/Inducer-Kombinationen:

TABELLE 3

Element	Inducer
MT II	Phorbolester (TFA) Schwermetalle
MMTV (Maus-Säuger-Tumorvirus)	Glucocorticoide
β-Interferon	poly(rI)X poly(rC)
Adenovirus 5 E2	Ela
c-jun	Phorbolester (TPA), H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Collagenase	Phorbolester (TPA)
Stromelysin	Phorbolester (TPA), IL-1
SV40	Phorbolester (TPA)
murines MX-Gen	Interferon, Newcastle-Disease-Virus
GRP78-Gen	A23187
α-2-Macroglobulin	IL-6
Vimentin	Serum

MHC-Klasse-I-Gen H -2kB	Interferon
HSP70	Ela, großes T-Antigen von SV40
Proliferin	Phorbolester-TPA
Tumornekrosefaktor	FMA
thyroidstimulierendes Hormon-α-Gen	Thyroidhormon

**[0061]** Bei bestimmten Ausführungsformen der Erfindung kann die Abgabe eines Expressionsvektors in eine Zelle in vitro oder in vivo durch Einschluss eines Markers in den Expressionsvektor identifiziert werden. Der Marker würde zu einer identifizierbaren Änderung der transfizierten Zelle führen, was eine leichte Identifizierung der Expression erlaubt. In der Regel unterstützt der Einschluss eines Arzneimittelselektionsmarkers das Klonieren und die Selektion von Transformanten. Alternativ können Enzyme, wie Herpes simplex-Virus-Thymi-

dinkinase (TK) (eukaryotisch) oder Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) (prokaryotisch) eingesetzt werden. Auch immunologische Marker können verwendet werden. Der selektierbare eingesetzte Marker wird nicht als bedeutend angesehen, solange er in der Lage ist, zusammen mit dem Polynucleotid, das p53 codiert, exprimiert zu werden. Weitere Beispiele für selektierbare Marker sind einem Fachmann gut bekannt.

**[0062]** Typischerweise wird ein Polyadenylierungssignal eingeschlossen, um eine ordnungsgemäße Polyadenylierung des Transkripts zu bewirken. Die Natur des Polyadenylierungssignals wird für die erfolgreiche Praxis der Erfindung nicht als essentiell angenommen, und jede solche Sequenz kann eingesetzt werden. Der Erfinder hat das SV40-Polyadenylierungssignal insofern verwendet, als es zweckmäßig war und bekanntlich in den eingesetzten Zielzellen gut funktioniert. Auch ein Terminator wird als Element des Expressionskonstrukts in Betracht gezogen. Diese Elemente können der Verstärkung des Message-Niveaus und Minimierung des Weiterlesens vom Konstrukt in andere Sequenzen dienen.

**[0063]** Bei bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung umfasst das Expressionskonstrukt einen Virus oder ein gentechnisch hergestelltes Konstrukt, das sich von einem Virusgenom ableitet. Die Fähigkeit bestimmter Viren in die Zelle über Rezeptor-vermittelte Endozytose einzudringen und sich in einigen Fällen in die Chromosomen der Wirtszelle zu integrieren, haben sie zu attraktiven Kandidaten für den Gentransfer in Säugerzellen gemacht. Da allerdings gezeigt wurde, dass die direkte Aufnahme von nackter DNA sowie die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von DNA-Komplexen (nachstehend diskutiert) möglich ist, brauchen die Expressionsvektoren nicht viral zu sein, sondern können statt dessen jedes beliebige Plasmid-, Cosmid- oder Phagenkonstrukt sein, das in der Lage ist, die Expression von codierten Genen in Säugerzellen zu unterstützen, wie die Plasmidserien pUC oder Bluescripts<sup>TM</sup>.

#### Retroviren

**[0064]** Die Retroviren sind eine Gruppe von einzelsträngigen RNA-Viren, die durch eine Fähigkeit zur Überführung ihrer RNA in doppelsträngige DNA in infizierten Zellen durch ein Verfahren der reversen Transkription (Coffin, 1990) gekennzeichnet ist. Die resultierende DNA integriert sich dann stabil in die zellulären Chromosome als ein Provir und steuert die Synthese von viralen Proteinen. Die Integration führt zur Retention der viralen Gensequenzen in der Empfängerzelle und ihren Abkömmlingen. Das retrovirale Genom enthält drei Gene – gag, pol und env – die Capsidproteine, Polymeraseenzym bzw. Hüllproteine codieren. Eine stromauwärts vom gag-Gen gefundene Sequenz, die als  $\Psi$  bezeichnet wird, funktioniert als Signal zum Packen des Genoms in Virionen. Zwei lange terminale Wiederholungs-(LTR)-Sequenzen sind am 5'- und 3'-Ende des viralen Genoms vorhanden. Diese enthalten starke Promotor- und Enhancersequenzen und sind auch zur Integration in das Wirtszellengenom erforderlich (Coffin, 1990).

**[0065]** Um einen retroviralen Vektor zu konstruieren, wird anstelle bestimmter viraler Sequenzen eine Nucleinsäure, die ein p53 codiert, in das virale Genom inseriert, um ein Virus, das replikationsdefekt ist, herzustellen. Um Virionen herzustellen, wird eine Verpackungszelllinie, die die gag-, pol- und env-Gene enthält, allerdings ohne die LTR- und  $\Psi$ -Komponenten, konstruiert (Mann et al., 1983). Wenn ein rekombinantes Plasmid, das eine menschliche cDNA enthält, zusammen mit den retrovirusalen LTR- und  $\Psi$ -Sequenzen in diese Zelllinie eingeführt wird (beispielsweise durch Calciumphosphatpräzipitation), erlaubt es die  $\Psi$ -Sequenz dem RNA-Transkript des rekombinanten Plasmids, in Viruspartikel verpackt zu werden, die anschließend in das Kulturmedium sezerniert werden (Nicolas und Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). Die Medien, die die rekombinanten Retroviren enthalten, werden anschließend gesammelt, gegebenenfalls konzentriert und für den Gentransfer verwendet. Retrovirale Vektoren sind in der Lage, eine breite Vielzahl von Zelltypen zu infizieren. Allerdings erfordern die Integration und stabile Expression die Teilung von Wirtszellen (Paskind et al., 1975).

**[0066]** Ein neuer konzipierter Weg, um das spezifische Targeting von Retrovirus-Vektoren zu ermöglichen, wurde unlängst auf der Grundlage der chemischen Modifikation eines Retrovirus durch die chemische Addition von Lactoseresten an die virale Hülle entwickelt. Diese Modifikation könnte die spezifische Infektion von Hepatocyten über Sialoglycoproteinrezeptoren ermöglichen.

**[0067]** Es wurde ein unterschiedlicher Weg zum Targeting rekombinanter Retroviren konzipiert, wobei biotinierte Antikörper gegen ein retrovirales Hüllprotein und gegen einen spezifischen Zellrezeptor eingesetzt wurden. Die Antikörper wurden über die Biotinkomponenten unter Verwendung von Streptavidin (Roux et al., 1989) gekoppelt. Unter Verwendung von Antikörpern gegen die Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-I- und -Klasse-II-Antigene zeigten sie die Infektion einer Vielzahl von menschlichen Zellen, die diese Oberflächen-Antigene tragen, mit einem ecotropischen Virus in vitro (Roux et al., 1989).

## Adenoviren

**[0068]** Menschliche Adenoviren sind doppelsträngige DNA-Tumoviren mit Genomgrößen von ungefähr 36 kb (Tooze, 1981). Als Modellsystem für die eukaryotische Genexpression wurden Adenoviren bereits intensiv untersucht sowie charakterisiert, was sie zu einem attraktiven System zur Entwicklung von Adenoviren als Gentransfersystem macht. Diese Gruppe von Viren ist leicht zu züchten und zu manipulieren und sie zeigen ein breites Wirtsspektrum in vitro und in vivo. In lytisch infizierten Zellen sind Adenoviren in der Lage, Wirtsproteinsynthese abzustellen, die Zellmaschinerie zur Synthese großer Mengen von viralen Proteinen zu steuern und große Virus-Mengen zu produzieren.

**[0069]** Die E1-Region des Genoms umfasst E1A und E1B, die Proteine, die für die Transkription zur Regulation des viralen Genoms verantwortlich sind, sowie einige zelluläre Gene codieren. Die E2-Expression, einschließlich E2A und E2B, gestattet die Synthese von viralen replikativen Funktionen, z.B. DNA-Bindungsprotein, DNA-Polymerase und ein terminales Protein, als Primer für die Replikation. E3-Genprodukte verhindern die Cytolyse durch cytotoxische T-Zellen und den Tumornekrosefaktor und sind anscheinend für die virale Propagation wichtig. Funktionen, die mit den E4-Proteinen zusammenhängen, umfassen DNA-Replikation, späte Genexpression und Abschaltung der Wirtszelle. Die späten Genprodukte umfassen den größten Teil der Viron-Capsidproteine, und diese werden nur exprimiert, nachdem der größte Teil der Verarbeitung eines einzelnen primären Transkripts aus dem größeren späten Promotor erfolgt ist. Der größere späte Promotor (MLP) zeigt während der späten Phase der Infektion eine hohe Wirksamkeit (Stratford-Perricaudet und Perricaudet, 1991a).

**[0070]** Da anscheinend nur ein kleiner Teil des viralen Genoms in cis erforderlich ist (Tooze, 1981), bieten Adenovirus-abgeleitete Vektoren ein ausgezeichnetes Potential für die Substitution von großen DNA-Fragmenten bei Verwendung in Verbindung mit Zelllinien, wie 293-Zellen. Ad5-transformierte menschliche embryonale Nierenzelllinien (Graham et al., 1977) wurden zur Bereitstellung der essentiellen Virusproteine in trans entwickelt. Der Erfinder hat somit gefolgert, dass die Merkmale von Adenoviren sie zu guten Kandidaten für die Verwendung beim Targeting von Krebszellen in vivo machen (Grunhaus & Horwitz, 1992).

**[0071]** Bestimmte Vorteile eines Adenovirussystems zur Abgabe von Fremdproteinen an eine Zelle umfassen (i) die Fähigkeit zur Substitution relativ großer Stücke von viraler DNA durch Fremd-DNA; (ii) die Strukturstabilität von rekombinanten Adenoviren; (iii) die Sicherheit der adenoviralen Verabreichung an Menschen; und (iv) jeglicher Mangel einer bekannten Verknüpfung einer adenoviralen Infektion mit Krebs oder Malignitäten; (v) die Fähigkeit zum Erhalt hoher Titer des rekombinanten Virus; und (vi) die hohe Infektiosität von Adenovirus.

**[0072]** Weitere Vorteile von Adenovirusvektoren gegenüber Retroviren umfassen die höheren Genexpressionsniveaus. Zusätzlich ist die Adenovirusreplikation im Gegensatz zu den retroviralen Sequenzen von der Wirtsgenreplikation unabhängig. Da adenovirale transformierende Gene in der E1-Region leicht deletiert werden können und immer noch wirksame Expressionsvektoren bereitstellen, wird davon ausgegangen, dass das onkogene Risiko von Adenovirusvektoren vernachlässigbar ist (Grunhaus & Horwitz, 1992).

**[0073]** Im Allgemeinen beruhen Adenovirusgen-Transfersysteme auf rekombinantem gentechnisch hergestelltem Adenovirus, der durch Deletion eines Teils seines Genoms, wie E1, replikationsinkompetent gemacht wurde und seine Kompetenz für die Infektion immer noch beibehält. Sequenzen, die relativ große Fremdproteine codieren, können exprimiert werden, wenn zusätzlich Deletionen in dem Adenovirusgenom vorgenommen werden. Beispielsweise sind Adenoviren, die sowohl in der E1- als auch E3-Region deletiert wurden, in der Lage, bis zu 10 kb Fremd-DNA zu tragen und können in 293-Zellen zu hohen Titern anwachsen (Stratford-Perricaudet und Perricaudet, 1991a). Überraschenderweise wurde auch über die persistente Expression von Transgenen und die anschließende adenovirale Infektion berichtet.

**[0074]** Der Adenovirus-vermittelte Gentransfer wurde neuerdings als Mittel zur Vermittlung des Gentransfers in eukaryotische Zellen und in ganze Tiere untersucht. Beispielsweise wurde beim Behandeln von Mäusen mit der seltenen rezessiven genetischen Störung Ornithintranscarbamylase-(OTC)-Mangel festgestellt, dass adenovirale Konstrukte zur Versorgung mit dem normalen OTC-Enzym eingesetzt werden könnten. Leider wurde die Expression von normalen OTC-Niveaus nur in 4 von 17 Instanzen erreicht (Stratford-Perricaudet et al., 1991b). Darum wurde der Defekt in den meisten Mäusen nur teilweise korrigiert und führt zu keiner physiologischen oder phänotypischen Änderung. Dieser Typ von Ergebnissen bietet darum wenig Ansporn zur Verwendung von adenoviralen Vektoren bei der Krebstherapie.

**[0075]** Versuche zur Verwendung des Adenovirus zum Transfer des Gens für den cystische Fibrose-Transmembran-Konduktanz-Regulator (CFTR) in das pulmonale Epithel von Baumwollratten waren ebenfalls zum Teil erfolgreich, obwohl es nicht möglich war, die biologische Aktivität des transferierten Gens in dem Epithel der Tiere zu bewerten (Rosenfeld et al., 1992). Wiederum zeigten diese Studien Gentransfer und -expression des CFTR-Proteins in Lungen-Luftweg-Zellen, sie zeigten allerdings keine physiologische Wirkung. In dem Science-Artikel von 1991 zeigten Rosenfeld et al. die Lungen-Expression eines  $\alpha$ 1-Antitrypsinproteins, wiederum zeigten sie allerdings keine physiologische Wirkung. In der Tat schätzten sie, dass die Expressionsniveaus, die sie beobachtet haben, nur etwa 2% des Niveaus betrugen, das zum Schutze der Lunge bei Menschen erforderlich ist, d. h. weit unterhalb desjenigen, das für eine physiologische Wirkung notwendig ist.

**[0076]** Das Gen für menschliches  $\alpha$ 1-Antitrypsin wurde durch intraportalen Injektion in die Leber von normalen Ratten eingebracht, wo es exprimiert wurde und zur Sekretion des eingebrachten menschlichen Proteins in das Plasma dieser Ratten führte (Jaffe et al., 1992). Allerdings und enttäuschend waren die Niveaus, die erhalten wurden, nicht hoch genug, um von therapeutischem Wert zu sein.

**[0077]** Dieser Typ von Ergebnissen zeigt nicht, dass Adenovirus in der Lage ist, die Expression von genug Protein in rekombinanten Zellen zu steuern, um eine physiologisch relevante Wirkung zu erzielen, und sie legen darum keine Brauchbarkeit des Adenovirussystems zur Verwendung im Zusammenhang mit der Krebstherapie nahe. Außerdem wurde vor der vorliegenden Erfindung davon ausgegangen, dass p53 nicht in eine Verpackungszelle eingebracht werden kann, wie diejenigen, die zur Herstellung von Adenovirus verwendet wurden, da es toxisch wäre. Da E1B von Adenovirus an p53 bindet, wurde davon ausgegangen, dass dies ein weiterer Grund dafür war, warum die Adenovirus- und p53-Technik nicht kombiniert werden konnte.

#### Weitere Virusvektoren als Expressionskonstrukte

**[0078]** Weitere Virusvektoren können bei der vorliegenden Erfindung als Expressionsprodukte eingesetzt werden. Vektoren, die sich von Viren ableiten, wie Vacciniavirus (Ridgeway, 1988; Baichwal und Sugden, 1986; Coupar et al., 1988), Adeno-assoziertes Virus (AAV) (Ridgeway, 1988; Baichwal und Sugden, 1986; Hermonat und Muzycska, 1984) und Herpesviren, können eingesetzt werden. Sie bieten mehrere attraktive Merkmale für verschiedene Säugerzellen (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal und Sugden, 1986; Coupar et al., 1988; Horwitz et al., 1990).

**[0079]** Mit der jüngsten Erkennung von defekten Hepatitis-B-Viren wurde eine neue Einsicht in die Struktur-Funktionsbeziehung von verschiedenen viralen Sequenzen gewonnen. In vitro Studien zeigten, dass das Virus die Fähigkeit zum Helfer-abhängigen Verpacken und zur reversen Transkription beibehalten konnte, trotz der Deletion von bis zu 80% seines Genoms (Horwitz et al., 1990). Dies legt nahe, dass große Teile des Genoms durch genetisches Fremdmaterial ersetzt werden könnten. Der Hepatotropismus und die Persistenz (Integration) waren besonders attraktive Eigenschaften für den auf die Leber gerichteten Gentransfer. Chang et al. führten unlängst das Chloramphenicol-Acetyltransferase-(CAT)-Gen in das Enten-Hepatitis-B-Virusgenom anstelle der Polymerase-, der Oberflächen- und prä-Oberflächen-codierenden Sequenzen ein. Es wurde mit dem Wildtypvirus in eine Vogel-Hapatomzelllinie cotransfiziert. Kulturmedien, die hohe Titer des rekombinanten Virus enthielten, wurden zur Infektion primärer Entenküken-Hepatocyten verwendet. Stabile CAT-Genexpression wurde mindestens 24 Tage nach der Transfektion nachgewiesen (Chang et al., 1991).

#### C. Alternative Verfahren zur Genabgabe

**[0080]** Um die Expression von p53-Konstrukten zu bewirken, muss der Expressionsvektor in eine Zelle abgegeben werden. Wie vorstehend beschrieben, erfolgt der bevorzugte Mechanismus für die Abgabe über eine Virusinfektion, wobei der Expressionsvektor in ein infektiöses Adenoviruspartikel verkapselt ist.

**[0081]** Auch mehrere nicht-virale Methoden für den Transfer von Expressionsvektoren in kultivierte Säugerzellen werden von der vorliegenden Erfindung betrachtet. Diese umfassen Calciumphosphatpräzipitation (Graham und Van Der Eb, 1973; Chen und Okayama, 1987; Rippe et al., 1990), DEAE-Dextran (Gopal, 1985), Elektroporation (Tur-Kaspa et al., 1986; Potter et al., 1984), direkte Mikroinjektion (Harland und Weintraub, 1985), DNA-beladene Liposomen (Nicolau und Sene, 1982; Fraley et al., 1979) und Lipofectamin-DNA-Komplexe, Zell-Ultrabeschallung (Fechheimer et al., 1987), Genbombardierung unter Verwendung von Hochgeschwindigkeitsmikroprojektilen (Yang et al., 1990), Polycationen (Boussif et al., 1995) und Rezeptor-vermittelte Transfektion (Wu und Wu, 1987; Wu und Wu, 1988). Einige von diesen Techniken können zur *in vivo* oder *ex vivo* Verwendung mit Erfolg übernommen werden.

**[0082]** Bei einer Ausführungsform der Erfindung kann der adenovirale Expressionsvektor einfach aus einem nackten rekombinanten Vektor bestehen. Der Transfer des Konstrukts kann durch jedes der vorstehend erwähnten Verfahren durchgeführt werden, welches physisch oder chemisch die Zellmembran durchlässig macht. Beispielsweise injizierten Dubensky et al. (1984) erfolgreich Polyomavirus-DNA in Form von  $\text{CaPO}_4$ -Präzipitaten in Leber und Milz von erwachsenen und neugeborenen Mäusen und wiesen eine aktive virale Replikation und akute Infektion nach. Benvenisty und Neshif (1986) zeigten auch, dass die direkte intraperitoneale Injektion von  $\text{CaPO}_4$ -präzipitierten Plasmiden zur Expression der transfizierten Gene führt. Es wird beabsichtigt, dass DNA, die ein p53-Konstrukt codiert, auch auf ähnliche Weise in vivo transferiert werden kann.

**[0083]** Eine weitere Ausführungsform der Erfindung zur Transferierung eines nackten DNA-Expressionsvirus in Zellen kann Teilchenbombardierung umfassen. Dieses Verfahren hängt von der Fähigkeit zur Beschleunigung von DNA-beschichteten Mikroprojektilen auf eine hohe Geschwindigkeit ab und erlaubt es ihnen, Zellmembranen zu durchstoßen und in Zellen einzudringen, ohne sie abzutöten (Klein et al., 1987). Mehrere Vorrichtungen zur Beschleunigung von kleinen Teilchen wurden bereits entwickelt. Eine solche Vorrichtung beruht auf einer Hochspannungsentladung unter Erzeugung eines elektrischen Stroms, welcher wiederum die Triebkraft bereitstellt (Yang et al., 1990). Die verwendeten Mikroprojektilen bestanden aus biologisch inerten Substanzen, wie Wolfram- oder Goldperlen.

**[0084]** Die selektierten Organe, einschließlich Leber, Haut und Muskelgewebe von Ratten und Mäusen, wurden in vivo bombardiert (Yang et al., 1990; Zelenin et al., 1991). Dies kann eine operative Exposition des Gewebes oder der Zellen erfordern, um jedes zwischen Pistole und Zielorgan liegende Gewebe zu beseitigen. DNA, die ein p53-Konstrukt codiert, kann über dieses Verfahren abgegeben werden.

**[0085]** Bei einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann der Expressionsvektor in ein Liposom eingeschlossen sein. Liposomen sind blasenförmige Strukturen, die durch eine Phospholipiddoppelschichtmembran und ein wässriges inneres Medium gekennzeichnet sind. Multilamellare Liposomen besitzen mehrere Lipidschichten, die durch wässriges Medium getrennt sind. Sie bilden sich spontan, wenn Phospholipide in einem Überschuss von wässriger Lösung suspendiert werden. Die Lipidkomponenten durchlaufen vor der Bildung von geschlossenen Strukturen ein Selbst-Rearrangement und schließen Wasser und aufgelöste Solute zwischen den Lipiddoppelschichten ein (Ghosh und Bachhawat, 1991). Ebenfalls in Betracht gezogen werden Lipofectamin-DNA-Komplexe.

**[0086]** Auch die Liposomen-vermittelte Polynucleotidabgabe und die Expression von Fremd-DNA in vitro waren sehr erfolgreich. Wong et al. (1980) zeigten die Durchführbarkeit einer Liposomen-vermittelten Abgabe und Expression von Fremd-DNA in kultivierten Hühner-Embryo-, HeLa- und Hepatomzellen. Nicolau et al. (1987) erreichten erfolgreich einen Liposom-vermittelten Gentransfer in Ratten nach intravenöser Injektion.

**[0087]** Bei bestimmten Ausführungsformen der Erfindung kann das Liposom mit einem hemagglutinierenden Virus (HVJ) komplexiert werden. Es hat sich gezeigt, dass dies die Fusion mit der Zellmembran erleichtert und den Zelleintritt von Liposomen-verkapselter DNA beschleunigt (Kaneda et al., 1989). Bei anderen Ausführungsformen kann das Liposom in Verbindung mit nukleären Nicht-Histon-Chromosomenproteinen (HMG-1) (Kato et al., 1991) komplexiert oder eingesetzt werden. Bei wieder anderen Ausführungsformen kann das Liposom in Verbindung sowohl mit HVJ und HMG-1 komplexiert oder eingesetzt werden. Dadurch, dass solche Expressionsvektoren beim Transfer und bei der Expression eines Polynucleotids in vitro und in vivo mit Erfolg eingesetzt wurden, sind sie dann für die vorliegende Erfindung anwendbar. Wenn ein Bacteriophage-Promotor in dem DNA-Konstrukt eingesetzt wird, ist es auch wünschenswert, eine entsprechende Bacteriophage-Polymerase in das Liposom einzuschließen.

**[0088]** Ein weiterer Mechanismus zum Übertragen von Expressionsvektoren in Zellen ist die Rezeptor-vermittelte Abgabe. Dieser Weg nutzt die selektive Aufnahme von Makromolekülen durch Rezeptor-vermittelte Endocytose in fast allen eukaryotischen Zellen aus. Aufgrund der Zelltyp-spezifischen Verteilung von verschiedenen Rezeptoren kann die Abgabe hoch spezifisch sein (Wu und Wu, 1993). Rezeptor-vermittelte Gen-Targeting-Vehikel bestehen im Allgemeinen aus zwei Komponenten: einem Zellrezeptor-spezifischen Ligand und einem DNA-Bindungsmittel. Mehrere Liganden wurden zum Rezeptor-vermittelten Gentransfer verwendet. Die besonders intensiv charakterisierten Liganden sind Asialoorosomucoid (ASOR) (Wu und Wu, 1987) und Transferrin (Wagner et al., 1993). Neuerdings wurde ein synthetisches Neoglycoprotein, welches denselben Rezeptor wie ASOR erkennt, als Genabgabevehikel verwendet (Ferkol et al., 1993; Perales et al., 1994), und auch der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) wurde zur Abgabe von Genen an Plattenepithelkarzinomzellen eingesetzt (Myers, EPO 0 273 085).

**[0089]** Bei anderen Ausführungsformen kann das Abgabevehikel einen Liganden und ein Liposom einschließen. Beispielsweise setzten Nicolau et al. (1987) Lactosylceramid, ein Galactose-terminales Asialgangliosid, das in Liposomen eingearbeitet ist, ein und stellten eine Zunahme in der Aufnahme des Insulingens durch Hepatocyten fest. Somit ist es machbar, dass ein adenoviraler Expressionsvektor auch in einen Zelltyp, wie Lungen-, Epithel- oder Tumorzellen, durch eine Anzahl von Rezeptor-Liganden-Systemen mit oder ohne Liposomen spezifisch abgegeben werden kann. Beispielsweise kann als Rezeptor zur vermittelten Abgabe des p53-Konstrukts in vielen Tumorzellen, die eine Aufregulierung des EGF-Rezeptors zeigen, der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) verwendet werden. Mannose kann zum Targeting des Mannoserezeptor auf den Leberzellen verwendet werden. Auch Antikörper auf CD5 (CLL), CD22 (Lymphom), CD25 (T-Zellen-Leukämie) und MAA (Melanom) können gleichermaßen als Targeting-Gruppierungen verwendet werden.

**[0090]** Bei bestimmten Ausführungsformen kann der Gentransfer leichter unter ex vivo Bedingungen durchgeführt werden. Die ex vivo Gentherapie bezieht sich auf die Isolierung von Zellen aus einem Tier, die Abgabe eines Polynukleotids in die Zellen, in vitro und die anschließende Rückführung der modifizierten Zellen in ein Tier. Dies kann die operative Entfernung von Gewebe/Organen aus einem Tier oder die primäre Kultur von Zellen und Geweben einschließen. Anderson et al., US-Patentschrift 5,399,346, offenbaren therapeutische ex vivo Verfahren. Während der ex vivo Kultur kann der Expressionsvektor das p53-Konstrukt exprimieren. Schließlich können die Zellen wieder in das Ursprungstier zurückgeführt werden oder einem verschiedenen Tier in einer pharmazeutisch verträglichen Form durch jedes nachstehend beschriebene Mittel verabreicht werden.

#### D. Pharmazeutische Zusammensetzung und Verabreichungswege

**[0091]** Wo die klinische Anwendung eines erfindungsgemäßen adenoviralen Expressionsvektors betrachtet wird, ist die Herstellung des Komplexes als pharmazeutisch geeignete Zusammensetzung für die beabsichtigte Anwendung notwendig. Im Allgemeinen hat dies die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Folge, die im Wesentlichen frei von Pyrogenen sowie von sämtlichen anderen Verunreinigungen ist, die für Menschen oder Tiere schädlich sein könnten. Es ist im Allgemeinen auch erwünscht, entsprechende Salze und Puffer einzusetzen, um den Komplex stabil zu machen und die Aufnahme des Komplexes durch die Zielzellen zu gestatten.

**[0092]** Wässrige Zusammensetzungen, die bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden, umfassen eine wirksame Menge des Expressionsvektors, gelöst oder dispergiert in einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder in einem wässrigen Medium. Solche Zusammensetzungen werden auch als bezeichnet. Die Begriffe "pharmazeutisch oder pharmakologisch verträglich" beziehen sich auf die molekularen Gruppierungen und Zusammensetzungen, die bei Verabreichung an ein Tier oder einen Menschen, wie angemessen, keine nachteilige allergische oder anderweitig unerwünschte Reaktion hervorrufen. Wie hier verwendet, umfasst "pharmazeutisch verträglicher Träger" jedes und sämtliche Lösungsmittel, Dispersionsmedien, Überzüge, bacterizide und fungizide Mittel, isotonische und absorptionsverzögernde Mittel und dergleichen. Die Verwendung von solchen Medien und Mitteln für pharmazeutisch aktive Substanzen ist aus der Technik gut bekannt. Außer insofern, als viele herkömmlichen Medien oder Mittel mit dem Wirkstoff inkompatibel sind, wird seine Verwendung in den therapeutischen Zusammensetzungen in Betracht gezogen. Ergänzende Wirkstoffe können ebenfalls in die Zusammensetzungen eingearbeitet werden.

**[0093]** Lösungen der aktiven Verbindungen als freie Base oder pharmakologisch verträgliche Salze können in Wasser, zweckmäßigerweise gemischt mit einem oberflächenaktiven Mittel, wie Hydroxypropylcellulose, hergestellt werden. Auch Dispersionen können in Glycerin, flüssigen Polyethylenglycolen, Gemischen davon und in Öl hergestellt werden. Unter den üblichen Aufbewahrungs- und Anwendungsbedingungen enthalten diese Präparate einen Konservierungsstoff, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern.

**[0094]** Die bei der vorliegenden Erfindung eingesetzten Expressionsvektoren und Abgabevehikel können klassische pharmazeutische Präparate umfassen. Die erfindungsgemäße Verabreichung von therapeutischen Zusammensetzungen erfolgt über jeden üblichen Weg, solange das Zielgewebe über diesen Weg zugänglich ist. Dies umfasst oral, nasal, bukkal, rektal, vaginal oder topisch. Alternativ erfolgt die Verabreichung orthopisch, intradermal, intraocular, subkutan, intramuskulär, intraperitoneal oder durch intravenöse Injektion. Solche Zusammensetzungen würden normalerweise als pharmazeutisch verträgliche Zusammensetzungen verabreicht werden, die physiologisch verträgliche Träger, Puffer oder andere Exzipientien einschließen.

**[0095]** Die bei der vorliegenden Erfindung eingesetzten therapeutischen Zusammensetzungen werden zweckmäßigerweise in Form von injizierbaren Zusammensetzungen entweder als flüssige Lösungen oder

Suspensionen verabreicht; feste Formen, die für die Auflösung oder Suspension in Flüssigkeit vor der Injektion geeignet sind, können ebenfalls hergestellt werden. Diese Präparate können auch emulgiert sein. Eine für solche Zwecke typische Zusammensetzung umfasst einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Beispielsweise kann die Zusammensetzung 10 mg, 25 mg, 50 mg oder bis zu etwa 100 mg von menschlichem Serumalbumin pro Milliliter phosphatgepufferte Salzlösung enthalten. Weitere pharmazeutisch verträgliche Träger umfassen wässrige Lösungen, nicht-toxische Exzipientien, einschließlich von Salzen, Konservierungsstoffen, Puffern und dergleichen. Beispiele für nicht-wässrige Lösungsmittel sind Propylenglycol, Polyethylenglycol, Pflanzenöl und injizierbare organische Ester, wie Ethyoleat. Wässrige Träger umfassen Wasser, alkoholische/wässrige Lösungen, Salzlösungen, parenterale Vehikel, wie Natriumchlorid, Ringer-Dextrose, etc. Intravenöse Vehikel umfassen fluide Ergänzungsmittel und Nahrungsergänzungsmittel. Die Konservierungsstoffe umfassen antimikrobielle Mittel, Antioxidantien, Chelatbildner und inerte Gase. Der pH und die genaue Konzentration der verschiedenen Komponenten der pharmazeutischen Zusammensetzung werden nach gut bekannten Parametern eingestellt.

**[0096]** Zusätzliche Formulierungen sind zur oralen Verabreichung geeignet. Orale Formulierungen umfassen solche typischen Exzipientien, wie beispielsweise Mannit, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Natriumsaccharin, Cellulose, Magnesiumcarbonat und dergleichen, in pharmazeutischer Qualität. Die Zusammensetzungen nehmen die Form von Lösungen, Suspensionen, Tabletten, Pillen, Kapseln, verzögert freisetzenden Formulierungen oder von Pulvern ein. Wenn der Weg topisch erfolgt, kann die Form eine Creme, eine Salbe, eine Paste, eine Flüssigkeit oder ein Spray sein.

**[0097]** Eine wirksame Menge des therapeutischen Mittels wird auf der Grundlage des beabsichtigten Ziels bestimmt, beispielsweise (i) Hemmung der Tumorzellenproliferation oder (ii) Eliminierung von Tumorzellen. Der Begriff "Dosierungseinheit" bezieht sich auf physiologisch diskrete Einheiten, die zur Verwendung in einem Individuum geeignet sind, wobei jede Einheit eine zuvor festgelegte Menge der therapeutischen Zusammensetzung enthält, die zur Erzeugung der gewünschten Antworten, vorstehend diskutiert, in Verbindung mit seiner Verabreichung, d. h. entsprechender Weg und Behandlungsregime, berechnet wird. Die zu verabreichende Menge, sowohl der Anzahl von Behandlungen als auch der Dosierungseinheit entsprechend, hängt von dem zu behandelnden Individuum, dem Zustand des Individuums und dem gewünschten Schutz ab. Die exakten Mengen der therapeutischen Zusammensetzungen hängen auch von der Beurteilung des praktizierenden Arztes ab und sind für jedes Individuum besonders.

**[0098]** Bei bestimmten Ausführungsformen kann es wünschenswert sein, dem Patienten eine kontinuierliche Versorgung der therapeutischen Zusammensetzungen bereitzustellen. Für die intravenöse oder intraarterielle Route wird dies durch ein Tropfsystem erreicht. Für die topischen Anwendungen würde eine wiederholte Anwendung eingesetzt werden. Für verschiedene Vorgehensweisen könnten verzögert freisetzende Formulierungen verwendet werden, die eingeschränkte, allerdings konstante Mengen des therapeutischen Mittels über einen und ausgedehnten Zeitraum bereitstellen. Für die interne Anwendung kann die kontinuierliche Perfusion der Region von Interesse bevorzugt sein. Dies könnte durch Katheterisierung, in einigen Fällen postoperativ, und anschließende kontinuierliche Verabreichung des therapeutischen Mittels erreicht werden. Die Dauer der Perfusion würde vom klinischen Arzt für den bestimmten Patienten und die bestimmte Situation gewählt werden, allerdings könnten die Zeiten von etwa 1–2 Stunden bis 2–6 Stunden, bis etwa 6–10 Stunden bis etwa 10–24 Stunden, bis etwa 1–2 Tage, bis etwa 1–2 Wochen oder länger reichen. Im Allgemeinen entspricht die Dosis durch kontinuierliche Perfusion der therapeutischen Zusammensetzung derjenigen, die durch eine einzige oder durch mehrere Injektionen verabreicht wird, eingestellt auf den Zeitraum, über den die Injektionen verabreicht werden. Es wird allerdings angenommen, dass durch die Perfusion höhere Dosen erzielt werden können.

#### Klinisches Protokoll für SCCHN

**[0099]** Ein klinisches Protokoll wurde zur Erleichterung der Behandlung der SCCHN-Krankheit unter Verwendung der adenoviralen Konstrukte, nachstehend in den Beispielen diskutiert, entwickelt. Nach diesem Protokoll werden Patienten mit dem histologischen Beweis eines Plattenepithelkarzinoms von Kopf und Hals ausgewählt. Die Patienten können – müssen allerdings nicht – zuvor Chemo-, Radio- oder Gentherapien erhalten haben. Optimalerweise haben die Patienten eine angemessene Knochenmarksfunktion (definiert als periphere absolute Granulocytenanzahl von  $> 2000/\text{mm}^3$  und Plättchenanzahl von  $100000/\text{mm}^3$ ), eine angemessene Leberfunktion (Bilirubin  $\leq 1,5 \text{ mg/dl}$ ) und eine angemessene Nierenfunktion (Creatinin  $< 1,5 \text{ mg/dl}$ ).

**[0100]** Das Protokoll sieht eine Einzeldosisverabreichung über eine intratumorale Injektion einer pharmazeutischen Zusammensetzung vor, die zwischen  $10^6$  und  $10^9$  infektiöse Partikel eines p53-Adenovirus-Expressi-

onskonstrukts enthält. Für Tumore von > 4 cm beträgt das verabreichte Volumen 4–10 ml (vorzugsweise 10 ml), während für Tumore von < 4 cm ein Volumen von 1–3 ml (vorzugsweise 3 ml) verwendet wird. Mehrfachinjektionen werden für eine einzige Dosis in Volumina von 0,1–0,5 ml in Abständen von ungefähr 1 cm oder mehr verabreicht.

**[0101]** Die Behandlung besteht aus etwa 6 während 2 Wochen verabreichten Dosen. Nach der Wahl durch den klinischen Arzt kann das Regime mit 6 Dosen jeweils in zwei 2 Wochen oder auf einer weniger häufigen Basis (monatlich, zweimonatlich, vierteljährlich, etc.) fortgesetzt werden.

**[0102]** Wo Patienten zur operativen Resektion geeignet sind, wird der Tumor, wie vorstehend beschrieben, für mindestens zwei aufeinander folgende Zweiwochen-Behandlungsdurchläufe behandelt. Nach Ablauf von einer Woche des zweiten (oder mehr, z.B. des dritten, vierten, fünften, sechsten, siebten, achten, etc.) Durchlaufs wird mit dem Patient die operative Resektion durchgeführt. Vor dem Verschließen der Inzision werden 10 ml einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die das p53-Adenovirus-Expressionskonstrukt ( $10^6$ – $10^9$  infektiöse Partikel) enthält, an der Operationsstelle (Operationsbett) abgegeben und für mindestens 60 min in Kontakt bleiben gelassen. Die Wunde wird geschlossen und ein Drain oder Katheter wird darin platziert. Am dritten postoperativen Tag werden zusätzliche 10 ml der pharmazeutischen Zusammensetzung über den Drain verabreicht und mit dem operativen Bett für mindestens zwei hin Kontakt bleiben gelassen. Das Absaugen wird dann durchgeführt und der Drain nach einer klinisch angemessenen Zeit entfernt.

#### Behandlung von künstlichen oder natürlichen Körperhöhlen

**[0103]** Eine der Hauptquellen von rekurrenter SCCHN ist die mikroskopische Residualerkrankung, die an der primären Tumorstelle, sowohl lokal als auch regional, nach der Tumorexzision zurückbleibt. Zusätzlich existieren analoge Situationen, wobei natürliche Körperhöhlen durch mikroskopische Tumorzellen inokuliert werden. Die wirksame Behandlung einer solchen mikroskopischen Erkrankung würde einen wesentlichen Fortschritt in den therapeutischen Behandlungsvorgaben darstellen.

**[0104]** Somit kann bei bestimmten Ausführungsformen ein Krebs durch chirurgische Exzision entfernt und eine "Höhle" erzeugt werden. Sowohl zum Zeitpunkt der Operation als auch danach (periodisch oder kontinuierlich) wird die therapeutische Zusammensetzung, die erfindungsgemäß angewandt wird, an die Körperhöhle verabreicht. d. h. im Wesentlichen eine "topische" Behandlung der Oberfläche der Höhle. Das Volumen der Zusammensetzung sollte ausreichen, um zu gewährleisten, dass die gesamte Oberfläche der Höhle von dem Expressionskonstrukt kontaktiert wird.

**[0105]** Bei einer Ausführungsform hat die Verabreichung einfach die Injektion der therapeutischen Zusammensetzung in die Höhle, die durch die Tumorexzision gebildet wurde, zur Folge. Bei einer anderen Ausführungsform kann die mechanische Anwendung über einen Schwamm, einen Tupfer oder eine andere Vorrichtung erwünscht sein. Beide dieser Wege können im Anschluss an die Tumorentfernung sowie während der initialen Operation angewandt werden. Bei wieder einer anderen Ausführungsform wird ein Katheter vor dem Verschluss der chirurgischen Eintrittsstelle in die Höhle inseriert. Sodann kann die Höhle für eine gewünschte Zeitspanne kontinuierlich perfundiert werden.

**[0106]** Bei einer anderen Form dieser Behandlung ist die "topische" Anwendung der therapeutischen Zusammensetzung auf eine natürliche Körperhöhle, wie Mund, Pharynx, Ösophagus, Larynx, Trachea, Pleuralhöhle, Peritonealhöhle, oder Hohlorganhohlräume, einschließlich Blase, Dickdarm, oder andere viszerale Organe, gerichtet. In dieser Situation kann ein signifikanter primärer Tumor in dem Hohlraum vorhanden sein oder nicht. Die Behandlung richtet sich auf eine mikroskopische Erkrankung in der Höhle, allerdings kann sie zufällig auch eine Primärtumormasse, wenn sie nicht vorher entfernt worden ist oder eine präneoplastische Läsion, die in dieser Höhle vorhanden sein kann, beeinflussen. Wiederum kann eine Vielzahl von Methoden zur Beeinflussung der "topischen" Aufbringung in diese viszeralen Organe oder Höhlenoberflächen eingesetzt werden. Beispielsweise kann die Mundhöhle in der Pharynx durch einfaches orales Spülen und Gurgeln mit Lösungen beeinflusst werden. Allerdings kann die topische Behandlung innerhalb der Larynx und Trachea eine endoskopische Sichtbarmachung und topische Abgabe der therapeutischen Zusammensetzung erfordern. Die viszeralen Organe, wie Blase oder Darmschleimhaut, können darin vorhandene Katheter mit Infusion oder wiederum eine direkte Sichtbarmachung mit einem Zystoskop oder einem anderen endoskopischen Instrument erfordern. Zu den Höhlen, wie Pleuralhöhle und Peritonealhöhle, kann der Zugang durch darin vorhandene Katheter oder über chirurgische Wege, die den Zugang zu diesen Bereichen bereitstellen, erfolgen.

## Überwachung der p53-Expression nach Verabreichung

**[0107]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung umfasst die Aufzeichnung der p53-Expression nach Verabreichung der therapeutischen Zusammensetzung. Da die Zerstörung von mikroskopischen Tumorzellen nicht beobachtet werden kann, ist es wichtig zu bestimmen, ob die Zielstelle wirksam mit dem Expressionskonstrukt kontaktiert worden ist. Dies kann durch Identifizieren der Zellen erreicht werden, in denen das Expressionskonstrukt aktiv das p53-Produkt produziert. Es ist allerdings wichtig, in der Lage zu sein, zwischen dem exogenen p53 und demjenigen, das in dem Tumor und in Nicht-Tumorzellen in dem Behandlungsbereich vorhanden ist, zu unterscheiden. Das Markieren des exogenen p53 mit einem Tracer-Element würde einen definitiven Beweis zur Expression dieses Moleküls und nicht einer endogenen Version davon bereitstellen.

**[0108]** Ein solcher Tracer wird durch das FLAG-Biosystem (Hopp et al., 1988) bereitgestellt. Das FLAG-Polypeptid ist ein Octapeptid (AspTyrLysAspAspAspAspLys) und seine kleine Größe unterbricht die Expression des abgegebenen Gentherapieproteins nicht. Die Coexpression von FLAG und dem Protein von Interesse wird durch die Verwendung von Antikörpern, die gegen das FLAG-Protein gezüchtet wurden, verfolgt.

**[0109]** Weitere immunologische Markersysteme, wie das 6XHis-System (Qiagen) können ebenfalls eingesetzt werden. Hierfür kann jedes lineare Epitop zur Erzeugung eines Fusionsproteins mit p53 verwendet werden, solange (i) die immunologische Integrität des Epitops nicht durch die Fusion beeinträchtigt wird und (ii) die funktionelle Integrität von p53 nicht durch die Fusion beeinträchtigt wird.

## E. Kombinationstherapie-Protokolle

**[0110]** Die Tumorzellen-Resistenz gegen DNA-schädigende Mittel stellt ein Hauptproblem bei der klinischen Onkologie dar. Ein Ziel der derzeitigen Krebsforschung besteht darin, Wege zu finden, um die Wirksamkeit der Chemo- und Radiotherapie durch ihre Kombination mit der Gentherapie zu verbessern. Beispielsweise induzierte das Herpes simplex-Thymidinkinase-(HS-TK)-Gen bei Verabreichung an Gehirntumore durch ein retrovirales Vektorsystem erfolgreich eine Empfindlichkeit gegenüber dem antiviralen Mittel Ganciclovir (Culver et al., 1992). Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird davon ausgegangen, dass die p53-Therapie gleichermaßen in Verbindung mit einem chemo- oder radiotherapeutischen Eingriff verwendet werden könnte.

**[0111]** Zur Abtötung von Zellen, wie bösartige oder metastatische, Zellen unter Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren würde im Allgemeinen eine "Ziel"-Zelle mit einem Expressionsvektor und mindestens einem DNA-schädigenden Mittel kontaktiert werden. Diese Zusammensetzungen würden in einer kombinierten Menge wirksam bereitgestellt werden, um die Proliferation der Zelle abzutöten oder zu hemmen. Dieser Prozess kann das Kontaktieren der Zellen mit dem Expressionsvektor und dem (den) DNA-schädigenden Mittel(n) oder Faktor(en) gleichzeitig umfassen. Dies kann durch Kontaktieren der Zelle mit einer einzigen Zusammensetzung oder einer einzigen pharmazeutischen Formulierung, die beide Mittel einschließt, oder durch Kontaktieren der Zelle mit zwei distinkten Zusammensetzungen oder Formulierungen gleichzeitig, wobei eine Zusammensetzung den p53-Expressionsvektor und die andere das DNA-schädigende Mittel umfasst, erreicht werden.

**[0112]** Alternativ kann die p53-Behandlung der Behandlung mit dem DNA-schädigenden Mittel in Intervallen, die von min bis Wochen reichen, vorausgehen oder ihr folgen. Bei Ausführungsformen, bei der der DNA-schädigende Faktor und der p53-Expressionsvektor getrennt auf die Zelle angewandt werden, würde im Allgemeinen sichergestellt werden, dass zwischen dem Zeitpunkt jeder Abgabe keine nennenswerte Zeit verstreicht, derart, dass das DNA-schädigende Mittel und der Expressionsvektor immer noch in der Lage sind, eine zweckmäßige kombinierte Wirkung auf die Zelle auszuüben. In solchen Fällen wird davon ausgegangen, dass die Zelle mit beiden Mitteln innerhalb von 6 Stunden bis 1 Woche miteinander und mehr bevorzugt innerhalb von etwa 24–72 Stunden, wobei eine Verzögerungszeit von nur etwa 48 Stunden besonders bevorzugt ist, kontaktiert werden würde. In einigen Situationen kann es wünschenswert sein, den Zeitraum der Behandlung wesentlich auszudehnen, wobei allerdings mehrere Tage (2, 3, 4, 5, 6 oder 7) bis mehrere Wochen (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8) zwischen den jeweiligen Verabreichungen liegen.

**[0113]** Es ist auch einsehbar, dass mehr als eine Verabreichung entweder des p53-Konstrukts oder des DNA-schädigenden Mittels erwünscht ist. Verschiedene Kombinationen können eingesetzt werden, wobei p53 "A" und das DNA-schädigende Mittel "B" ist:

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

**[0114]** Um eine Zellabtötung zu erreichen, werden beide Mittel in einer kombinierten Menge, die zum Abtöten der Zelle wirksam ist, an eine Zelle abgegeben.

**[0115]** DNA-schädigende Mittel oder Faktoren sind hier als jede chemische Verbindung oder Behandlungs-methode definiert, die eine DNA-Schädigung auslöst, wenn sie auf eine Zelle angewandt wird. Solche Mittel und Faktoren umfassen Bestrahlung und Wellen, die eine DNA-Schädigung auslösen, wie  $\gamma$ -Strahlen, Rönt-genstrahlen, UV-Bestrahlung, Mikrowellen, elektronische Emissionen und dergleichen. Eine Vielzahl von chemischen Verbindungen, auch als "chemotherapeutische Mittel" beschrieben, funktioniert zur Auslösung einer DNA-Schädigung, wovon alle bei den hier offenbarten Kombinationsbehandlungsmethoden geeignet sein sollen. Chemotherapeutische Mittel, die als geeignet angesehen werden, umfassen z.B. Adriamycin, 5-Fluoruracil (5FU), Etoposide (VP-16), Camptothecin, Actinomycin-D, Mitomycin C, Cisplatin (CDDP) und auch Wasser-stoffperoxid. Die Erfindung umfasst auch die Verwendung einer Kombination von einem oder mehreren DNA-schädigenden Mitteln, gleich ob auf der Grundlage von Strahlung oder von tatsächlichen Verbindungen, wie die Verwendung von Röntgenstrahlen mit Cisplatin oder die Verwendung von Cisplatin mit Etoposid. Bei bestimmten Ausführungsformen ist die Verwendung von Cisplatin in Kombination mit einem p53-Expression-vektor besonders bevorzugt.

**[0116]** Bei der erfindungsgemäßen Behandlung von Krebs würden die Tumorzellen mit einem DNA-schädi-genden Mittel, zusätzlich zu dem Expressionsvektor, behandelt werden. Dies kann durch Bestrahlung der loka-ten Tumorstelle mit einer DNA-schädigenden Strahlung, wie Röntgenstrahlen, UV-Licht,  $\gamma$ -Strahlen oder auch Mikrowellen, erreicht werden. Alternativ können die Tumorzellen mit dem DNA-schädigenden Mittel durch Ver-abreichung an das Individuum einer therapeutisch wirksamen Menge einer pharmazeutischen Zusam-mensetzung, die eine DNA-schädigende Verbindung umfasst, wie Adriamycin, 5-Fluoruracil, Etoposid, Camptothecin, Actinomycin-D, Mitomycin C, oder stärker bevorzugt Cisplatin, kontaktiert werden. Das DNA-schädigende Mittel kann hergestellt und als therapeutische Kombinationszusammensetzung oder als Testsatz verwendet wer-den, indem es mit einem p53-Expressionsvektor, wie vorstehend beschrieben, kombiniert wird.

**[0117]** Mittel, die direkt Polynucleotide, insbesondere DNA, vernetzen, werden in Betracht gezogen, und wird hier gezeigt, dass sie eine DNA-Schädigung auslösen, die zu einer synergistischen antineoplastischen Kom-bination führt. Mittel, wie Cisplatin und andere DNA-alkylierende Mittel, können eingesetzt werden. Cisplatin wird bereits zur Behandlung von Krebs breit eingesetzt, mit angewandten wirksamen Dosen bei klinischen An-wendungen von  $20 \text{ mg/m}^2$  5 Tage lang alle 3 Wochen mit insgesamt drei Durchgängen. Cisplatin wird nicht oral absorbiert und muss darum über eine Injektion intravenös, subkutan, intratumoral oder intraperitoneal verab-reicht werden.

**[0118]** Mittel, die die DNA schädigen, umfassen auch Verbindungen, die in die DNA-Replikation, Mitose und in die chromosomale Segregation eingreifen. Solche chemotherapeutischen Verbindungen umfassen Adria-mycin, auch als Doxorubicin bekannt, Etoposid, Verapamil, Podophyllotoxin und dergleichen. Breit eingesetzt bei einer klinischen Versuchsanordnung zur Behandlung von Neoplasmen werden diese Verbindungen durch Bolusinjektionen intravenös in Dosen im Bereich von  $25\text{--}75 \text{ mg/m}^2$  in 21-tägigen Intervallen für Adriamycin, von  $35\text{--}50 \text{ mg/m}^2$  für Etoposid intravenös oder das Doppelte der intravenösen Dosis oral verabreicht.

**[0119]** Mittel, die die Synthese und die genaue Wiedergabe von Polynucleotidvorläufern und Untereinheiten stören, führen auch zu einer DNA-Schädigung. Als solche wurde eine Anzahl von Polynucleotidvorläufern ent-wickelt. Besonders geeignet sind Mittel, die eine umfangreiche Testung durchlaufen haben und leicht verfügbare sind. Als solche werden bevorzugt Mittel, wie 5-Fluoruracil (5-FU), bei neoplastischem Gewebe verwendet, was diese Mittel besonders geeignet macht, um sie auf die neoplastischen Zellen zu richten. Obwohl recht to-xisch, ist 5-FU in einem breiten Bereich von Trägern anwendbar, einschließlich der topischen Verabreichung, wobei allerdings die intravenöse Verabreichung mit Dosen im Bereich von 3 bis 15 mg/kg/Tag im Allgemeinen verwendet wird.

**[0120]** Weitere Faktoren, die zu einer DNA-Schädigung führen können und intensiv verwendet wurden, um-fassen diejenigen, die im Allgemeinen als  $\gamma$ -Strahlen, Röntgenstrahlen, und/oder die direkte Verabreichung von Radioisotopen an Tumorzellen bekannt ist. Weitere Formen von DNA-schädigenden Faktoren werden

ebenfalls in Betracht gezogen, wie Mikrowellen und UV-Bestrahlung. Es ist sehr wahrscheinlich, dass alle diese Faktoren einen breiten Bereich von DNA-Schädigung oder den Vorläufern von DNA der Replikation und Reparatur von DNA und dem Zusammenbau und der Aufrechterhaltung von Chromosomen bewirken. Dosierungsbereiche für Röntgenstrahlen reichen von Tagesdosen von 50 bis 200 Röntgen für längere Zeiträume (3 bis 4 Wochen) bis zu Einzeldosen von 2000 bis 6000 Röntgen. Die Dosierungsbereiche für Radioisotope variieren breit und hängen von der Halbwertsdauer des Isotops, der Stärke und vom Typ der emittierten Strahlung und von der Aufnahme durch die neoplastischen Zellen ab.

**[0121]** Der Fachmann wird auf "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15. Ausgabe, Kapitel 33, insbesondere Seiten 624–652 verwiesen. Einige Variationen in der Dosierung erfolgen notwendigerweise in Abhängigkeit von dem Zustand des Individuums, das behandelt wird. In jedem Fall bestimmt die für die Verabreichung verantwortliche Person die entsprechende Dosis für das jeweilige Individuum. Ferner sollten für die menschliche Verabreichung die Präparate Sterilität, Pyrogenität, allgemeine Sicherheit und Reinheitsstandards, wie sie vom FDA Office of Biologics Standards gefordert werden, erfüllen.

**[0122]** Der Erfinder schlägt vor, dass die regionale Abgabe von p53-Expressionsvektoren an Patienten mit p53-zusammenhängenden Krebserkrankungen ein sehr wirksames Verfahren zur Abgabe eines therapeutisch wirksamen Gens ist, um der klinischen Erkrankung entgegenzuwirken. Gleichermaßen kann die Chemo- oder Radiotherapie auf eine bestimmte befallene Region des Körpers des Individuums gerichtet sein. Alternativ kann die systemische Verabreichung des Expressionsvektors oder des DNA-schädigenden Mittels bei bestimmten Umständen angemessen sein, beispielsweise wo ausgiebige Metastasen aufgetreten sind.

**[0123]** Die Cytokintherapie hat sich ebenfalls als wirksamer Partner für Kombinationstherapie-Behandlungsvorgaben erwiesen. Verschiedene Cytokine können bei solchen kombinierten Wegen eingesetzt werden. Beispiele für Cytokine umfassen IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, TGF- $\beta$ , GM-CSF, M-CSF, G-CSF, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ . Cytokine werden nach den Standard-Regimen, wie vorstehend beschrieben, im Einklang mit den klinischen Indikationen, wie Zustand des Patienten und relative Toxizität des Cytokins, verabreicht.

**[0124]** Zusätzlich zur Kombinierung der p53-Zieltherapien mit Chemo-, Radio- und Cytokintherapien wird auch davon ausgegangen, dass eine Kombination mit anderen Gentherapien zweckmäßig ist. Beispielsweise kann gleichzeitiges Targeting von K-ras- und p53-Mutationen eine verbesserte Antikrebsbehandlung hervorrufen. Auf jedes andere tumorverwandte Gen, das denkbar ist, kann auf diese Weise gezielt werden. Beispielsweise die Familie der Gene p21, p16, p27, E<sub>2</sub>F, Dp, Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, FCC, MCC, andere ras-Moleküle, myc, neu, raf, erb, src, fms, jun, trk, ret, gsp, hst, bcl und abl. Es kann auch wünschenswert sein, die p53-Therapie mit einer auf Antikörper beruhenden gentherapeutischen Behandlung zu kombinieren, umfassend die Verwendung eines einzelsträngigen Antikörperkonstrukts, in dem der Antikörper an eines der vorhergehenden Moleküle bindet oder in Kombination mit Genen, die ein oder mehrere der oben aufgelisteten Cytokine codieren. Es kann auch zweckmäßig sein, p53 mit anderen Genen zu kombinieren, die an apoptotischen Prozessen beteiligt sind, z.B. Adenovirus E1A, Bax, Bcl-X<sub>s</sub>, etc.

#### F. Testsätze

**[0125]** Alle essentiellen Materialien und Reagenzien, die zur Hemmung der Tumorzellenproliferation erforderlich sind, können miteinander in einem Testsatz zusammengefügt sein. Dieser umfasst im Allgemeinen ausgewählte adenovirale Expressionsvektoren. Ebenfalls eingeschlossen sein können verschiedene Medien zur Replikation der Expressionsvektoren und Wirtszellen für eine solche Replikation. Solche Testsätze umfassen distinkte Behälter für jedes einzelne Reagens.

**[0126]** Wenn die Komponenten des Testsatzes in einer oder mehreren flüssigen Lösungen) bereitgestellt werden, ist die flüssige Lösung vorzugsweise eine wässrige Lösung, wobei eine sterile wässrige Lösung besonders bevorzugt ist. Für die in vivo Anwendung kann der Expressionsvektor zu einer pharmazeutisch verträglichen spritzbaren Zusammensetzung formuliert sein. In diesem Fall können die Behältermittel selbst ein Inhalator, eine Spritze, eine Pipette, eine Augentropfvorrichtung oder eine andere derartige Apparatur sein, aus der die Formulierung auf einen infizierten Bereich des Körpers, wie die Lungen, aufgebracht werden kann, in ein Tier injiziert werden kann oder auch mit den anderen Komponenten des Testsatzes aufgebracht werden kann auf und gemischt werden kann.

**[0127]** Die Komponenten des Testsatzes können auch in getrockneter oder lyophilisierter Form bereitgestellt

werden. Werden Reagentien oder Komponenten als getrocknete Form bereitgestellt, erfolgt die Rekonstitution im Allgemeinen durch Zugabe eines geeigneten Lösungsmittels. Es ist beabsichtigt, dass das Lösungsmittel auch in einem anderen Behältermittel bereitgestellt werden kann.

**[0128]** Die Testsätze umfassen typischerweise auch ein Mittel, um die Röhrchen in einem verschlossenen Behältnis zum kommerziellen Verkauf, wie z.B. spritz- oder blasgeformte Kunststoff Behälter, in denen die gewünschten Röhrchen enthalten sind, einschließen. Ohne Rücksicht auf die Anzahl oder den Typ von Behältern können die Testsätze auch ein Instrument zur Unterstützung der Inkjektion/Nerabreichung oder Platzierung der fertigen Komplexzusammensetzung im Körper eines Tiers umfassen oder damit verpackt sein. Ein solches Instrument kann ein Inhaliergerät, eine Spritze, Pipette, Pinzette, ein Messlöffel, eine Augentropfvorrichtung oder jedes andere medizinisch bewährte Abgabeverhikel sein.

#### G. Tiermodell zur mikroskopischen Tumorinokulation und Residualerkrankung

**[0129]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung umfasst die Entwicklung eines Tiermodells zur Analyse von mikroskopischen Residualkarzinomen und mikroskopischen Inokulation von Körperhöhlen. "Karzinom", wie hier verwendet, kann sich auf eine einzelne Zelle oder eine mehrzellige Tumormasse beziehen. Bei einer mikroskopischen Erkrankung besteht der "Tumor" aus einer oder einigen wenigen Karzinomzellen, die mit dem bloßen Auge nicht beobachtet werden können.

**[0130]** Das hier beschriebene Tiermodell simuliert insbesondere (i) die postoperative Umgebung von Kopf- und Halskrebspatienten, insbesondere in den fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung und (ii) die Körperhöhle eines befallenen Individuums, wobei sich ein mikroskopisches Karzinom entwickelt hat. Das Modell leitet sich, entsprechend anderen Tiermodellen für Krebs, von der Inokulation von Tumorzellen in ein Tier ab. Eine Unterscheidung allerdings liegt darin, dass subkutan eine Tasche geschaffen wird, die ein physiologisches Äquivalent zu einer natürlichen Körperhöhle oder zu einer postoperativen Körperhöhle darstellt, die durch die Exzision einer Tumormasse erzeugt worden ist.

**[0131]** Die vorliegenden Erfindungen ziehen als Beispiel Nacktmäuse als Modellorganismus heran. Praktisch kann jedes Tier eingesetzt werden, allerdings zur erfindungsgemäßen Verwendung. Besonders bevorzugte Tiere sind kleine Säuger, die routinemäßig bei Laborprotokollen verwendet werden. Noch stärker bevorzugte Tiere sind diejenigen aus der Nagergruppe, wie Mäuse, Ratten, Meerschweinchen und Hamster. Kaninchen sind ebenfalls eine bevorzugte Spezies. Die Kriterien zur Auswahl eines Tiers hängen großenteils von der besonderen Präferenz eines Forschers ab.

**[0132]** Der erste Schritt besteht darin, einen Gewebelappen in dem experimentellen Tier zu erzeugen. Der Begriff "Gewebelappen" bedeutet eine Inzision im Fleisch des Tieres, die das Zielgewebe exponiert. Es ist im Allgemeinen bevorzugt, dass eine Inzision in der dorsalen Flanke eines Tiers erfolgt, die eine leicht zugängliche Stelle darstellt. Es ist allerdings selbstverständlich, dass eine Inzision auch an anderen Punkten auf dem Tier vorgenommen werden könnte, und die Wahl der Gewebestellen kann von verschiedenen Faktoren abhängig sein, wie dem bestimmten Typ von Therapeutika, die untersucht werden.

**[0133]** Nachdem eine Zielgewebestelle exponiert ist, werden die Karzinomzellen, entweder einzeln oder in mikroskopischen Tumoren mit der Gewebestelle in Kontakt gebracht. Die zweckmäßigste Weise zum Inokulieren der Krebszellen in die Gewebestelle besteht im Aufbringen einer Suspension von Gewebekulturmedium, das die Zellen enthält, auf das exponierte Gewebe. Die Krebszellen-Applikation kann durch einfache Verwendung einer Sterilpipette oder jedes anderen zweckmäßigen Applikators erreicht werden. Natürlich wird diese Verfahrensweise unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

**[0134]** Bei einer Ausführungsform werden  $2,5 \times 10^6$  SCCHN-Zellen in die exponierte Gewebetasche einer Nacktmaus inokuliert. Die Fachleute sind in der Lage für einen gegebenen Zweck leicht zu bestimmen, welches die geeignete Anzahl von Zellen ist. Die Anzahl von Zellen hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie der Größe des Tieres, der Inzisionsstelle, der Replikationskapazität der Tumorzellen selbst, der Zeit, die für das Tumorwachstum beabsichtigt ist, der potentiellen zu testenden Antitumortherapie und dergleichen. Obwohl die Entwicklung eines optimalen Modellsystems für jeden bestimmten Typ von Tumor eine bestimmte Einstellung in der Anzahl der verabreichten Zellen erfordern kann, bedeutet dies keinesfalls ein übergebührliches Maß an experimenteller Arbeit. Die Fachleute auf dem Gebiet der Tierversuche wissen, dass eine solche Optimierung erforderlich ist.

**[0135]** Dies kann beispielsweise durch das Durchführen von Vorversuchen erreicht werden, wobei unter-

schiedliche Anzahlen von Zellen an das Tier abgegeben werden und das Zellwachstum nach dem Wiederver-schließen der Gewebetasche überwacht wird. Natürlich ergibt die Verabreichung von größeren Anzahlen von Zellen eine größere Population von mikroskopischen Residualtumorzellen.

**[0136]** Bei der vorliegenden Untersuchung wurden die Hautlappen unter Verwendung von Matratzennähten wirksam verschlossen. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass Fachleute jedes aus einer Vielzahl von Methoden einsetzen können, die routinemäßig zum Verschließen der Inzision eingesetzt werden, wie die Verwendung von Klebstoffen, Klemmen, Stichen, chirurgischen Nahtmaterialien, etc., in Abhängigkeit von der be-stimmten betrachteten Verwendung.

#### H. Beispiele

**[0137]** Die folgenden Beispiele sind hauptsächlich zur Erläuterung bestimmter spezielle Ausführungsformen bereitgestellt und sollten keineswegs als Einschränkung des Umfangs der Erfindung betrachtet werden.

#### BEISPIEL 1

Wachstumssuppression von menschlichen Kopf- und Halskrebszellen durch das Einbringen eines Wild-typ-p53-Gens über ein rekombinantes Adenovirus

##### Materialien und Methoden

**[0138]** Zelllinien und Kulturbedingungen. Menschliche SCCHN-Zelllinien Tu-138 und Tu-177 wurden beide am Department of Head and Neck Surgery, M. D. Anderson Cancer Center, entwickelt. Tu-138 und Tu-177 wurden aus dem gingivo-labialen mäßig differenzierten Plattenepithel- bzw. einem schlecht differenzierten Platte-nepithel der Larynx entwickelt. Beide Zelllinien wurden mittels primärer Explantatechnik entwickelt und sind in athymischen Nackt- und SCID-Mäusen cyto-keratinpositiv und kanzerogen. Diese Zellen wurden in DMEM/F12-Medium, angereichert mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Rinderserum (FBS) mit Penicillin/Strep-tomycin gezüchtet.

##### Rekombinante Adenovirus-Präparation und -Infektion

**[0139]** Das rekombinante p53-Adenovirus (Ad5CMV-p53) (Zhang et al., 1994) enthält den Cytomegalovi-rus-(CMV)-Promotor, Wildtyp-p53-cDNA und ein SV40-Polyadenylierungssignal in einer Minigenkassette, die in die E1-deletierte Region des modifizierten Adenovirus Typ 5 (Ad5) inseriert ist.

**[0140]** Virale Stammlösungen wurden in 293 Zellen propagiert. Die Zellen wurden 36–40 h nach der Infektion geerntet, pelletiert, in Phosphat-gepufferter Salzlösung resuspendiert, lysiert und Zelltrümmer wurden durch die Durchführung einer CsCl-Gradientenreinigung entfernt. Das konzentrierte Virus wurde dialysiert, aliquotiert und bei –80°C gelagert. Die Infektion wurde durch Zugabe des Virus in DMEM/F12-Medium und 2% FBS zu Zell-Monolayern durchgeführt, die Zellen wurden 60 min bei 37°C unter konstantem Rühren inkubiert, anschlie-ßend wurde das komplette Medium (DMEM/F12/10% FBS) zugesetzt und die Zellen wurden für die gewünschte Zeitspanne bei 37°C inkubiert.

**[0141]** Northern Blot Analyse. Gesamt-RNA wurde durch das Säure-Guanidiniumthiocyanatverfahren von (Chomczynski und Sacchi, 1987) isoliert. Die Northern Blot Analysen wurden mit 20 µg der Gesamt-RNA durchgeführt. Die Membran wurde mit einer p53-cDNA-Sonde, markiert durch das statistische Primerverfahren in 5 × SSC/5 × Denhardts-Lösung/0,5% SDS/denaturierte Lachssperma-DNA (20 µg/ml) hybridisiert. Die Mem-bran wurde auch abgestreift und für eine RNA-Ladungskontrolle wieder mit GAPDH-cDNA als Sonde versetzt. Die exprimierten relativen Mengen von p53 wurden durch ein Densitometer (Molecular Dynamics Inc., Sunny-vale, CA) bestimmt.

##### Western Blot Analyse.

**[0142]** Western Blot Analyse. Gesamtzelllysate wurden durch 5 s Ultrabeschallung der Zellen 24 h nach Infektion in RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 1,0% NP-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 50 mM Tris, pH 8,0) hergestellt. Mit 50 µg Protein aus den Proben wurde eine 10%-SDS-PAGE durchgeführt und auf Hybond-ECL-Membran (Amersham) übergeführt. Die Membran wurde mit Blotto/Tween (5% fettfreie Trockenmilch, 0,2% Tween 20, 0,02% Natriumazid in Phosphat-gepufferter Salzlösung) blockiert und mit den primären Antikörpern, Maus-An-ti-Human-p53-monoklonalem Antikörper PAb1801 und Maus-Anti-Human-β-Actin-monoklonalem Antikörper

(Amersham) und dem sekundären Antikörper Meerrettichperoxidase-konjugiertem Ziegen-Anti-Maus-IgG (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) als Sonde versetzt. Die Membran wurde verarbeitet und, wie vom Hersteller vorgeschlagen, entwickelt.

**[0143]** Immunhistochemische Analyse. Die infizierten Zellmonolayer wurden mit 3,8% Formalin fixiert und mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol 5 min behandelt. Die immunhistochemische Färbung wurde unter Verwendung des Vectastain Elite Testsatzes (Vector, Burlingame, CA) durchgeführt. Der verwendete primäre Antikörper war der Anti-p53-Antikörper PAb1801, und der sekundäre Antikörper war ein Avidin-markiertes Anti-Maus-IgG (Vector). Das biotinylierte Meerrettichperoxidase-ABC-Komplex-Reagens wurde zum Nachweis des Antigen-Antikörper-Komplexes verwendet. Bei jedem Immunfärbeexperiment wurden Adsorptions-Vorkontrollen angewandt. Die Zellen wurden anschließend mit Harris-Hämatoxylin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) gegengefärbt.

**[0144]** Zellwachstumstest. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/ml in 6-Well-Platten in dreifacher Ausführung aufgestrichen. Die Zellen wurden entweder mit Wildtyp (Ad5CMV-p53) oder mit replikationsdefektem Adenovirus als Kontrolle infiziert. Die Zellen wurden alle 2 Tage geerntet, gezählt und ihre Lebensfähigkeit wurde durch Trypanblau-Ausschluß bestimmt.

**[0145]** Hemmung des Tumorwachstums in vivo. Die Wirkung von Ad5CMV-p53 auf die entwickelten subkutanen Tumorknoten wurde in Nacktmäusen in einer definierten pathogenfreien Umgebung bestimmt. Die Experimente wurden von behördlichen Komitees sowohl auf den Tierschutz als auch den Einsatz der Genforschung überprüft und genehmigt. Kurz gesagt, wurden nach der Induktion von Acepromazin/Ketamin-Anästhesie drei getrennte subkutane Hautlappen bei jedem Tier aufgeklappt, und  $5 \times 10^6$  Zellen in 150 ml Komplettmedium wurden subkutan in jeden Hautlappen unter Verwendung einer stumpfen Nadel injiziert; die Zellen wurden mit einer horizontalen Matratzenhaft in der Tasche gehalten. Für jede Zelllinie wurden vier Tiere verwendet. Nach 4 Tagen wurden die Tiere wieder anästhesiert, und die Hautlappen wurden zur Abgabe von 100 ml von 1) Ad5CMV-p53 (50 MOI) in den rechten vorderen Hautlappen; 2) replikationsdefektem Virus (50 MOI) in den rechten hinteren Hautlappen; und 3) Transportmedium allein in die linke hintere Flanke erneut aufgeklappt. Sämtliche Injektionsstellen hatten subkutane sichtbare und tastbare Knoten entwickelt, bevor die Behandlung verabreicht wurde. Die Tiere wurden täglich beobachtet und nach 20 Tagen getötet. Das in vivo Tumorvolumen wurde unter der Annahme einer kugeligen Form berechnet, wobei der durchschnittliche Tumordurchmesser als Quadratwurzel des Produkts der Querschnittsdurchmesser berechnet wurde. Nach der Tötung wurden die herausgeschnittenen Tumore mit einer Mikrometerschraube dreidimensional vermessen, um das Tumorvolumen zu bestimmen. Ein nicht-parametrischer Zwei-Wege-Friedmann-ANOVA-Test wurde zum Testen der Signifikanz des Unterschiedes zwischen den gemittelten Proben verwendet. Das Softwarepaket SPSS/PC+ (SPSS Inc. Chicago, IL) wurde verwendet.

### Ergebnisse

**[0146]** Adenovirale Infektion von SCCHN-Zellen. Die Bedingungen für die optimale adenovirale Transduktion von Tu-138- und Tu-177-Zellen wurde durch Infektion dieser Zellen mit Adenovirus, der das E. coli-β-gal-Gen exprimiert, bestimmt. Die Transduktionseffizienz wurde durch Zählen der Anzahl von blauen Zellen nach X-gal-Färbung bewertet. Es bestand anscheinend eine lineare Beziehung zwischen der Anzahl von infizierten Zellen und der Anzahl von verwendeten Adenovirusteilchen. Die mit einer einzigen Dosis von 100 MOI β-gal-Adenovirus angeimpften Zellen zeigten 60% blaue Zellen ([Fig. 1](#)), und dies wurde durch mehrere Infektionen auf 100% verbessert. Die Transduktionseffizienz dieses Vektors in SCCHN-Zellen ist zu derjenigen von anderen zuvor untersuchten Zelllinien recht unterschiedlich: HeLa, HepG2, LM2 und humane nicht-kleinzelige Lungenkrebszelllinien zeigten 97% bis 100% Infektionseffizienz nach Inkubation mit 30 bis 50 MOI-β-gal-Adenovirus (Zhang et al., 1994).

**[0147]** Expression von exogener p53-mRNA in Adenovirus-infizierten SCCHN-Zellen. Für diese Studie wurden zwei humane SCCHN-Zelllinien gewählt: Beide Zelllinien, Tu-138 und Tu-177, besitzen ein mutiertes p53-Gen. Dieses unlängst erzeugte rekombinante Wildtyp-p53-Adenovirus, Ad5CMV-p53, wurde zur Infektion von Tu-138- und Tu-177-Zellen verwendet. 24 h nach der Infektion wurde die Gesamt-RNA isoliert, und eine Northern Blot Analyse wurde durchgeführt. Die transformierte primäre menschliche embryonale Nierenzelllinie 293 wurde aufgrund ihres hohen Expressionsniveaus des p53-Genprodukts als positive Kontrolle verwendet, wohingegen K562, eine Lymphoblastomzelllinie mit einer homozygoten Deletion des p53-Gens, die negative Kontrolle war. Die Niveaus der endogenen 2,8 kb p53-mRNA, die in den Proben nachgewiesen wurden, die aus den mock-infizierten Zellen und aus den Zellen, die mit einem replikationsdefekten Adenovirus dl312 infiziert waren, waren ähnlich. Bis zu 10fach höhere Niveaus an exogener 1,9 kb p53-mRNA waren in den mit Ad5CMV-p53 infizierten Zellen vorhanden, was anzeigt, dass die exogene p53-cDNA erfolgreich in diese Zel-

len transduziert und effektiv transkribiert wurde. Interessanterweise war das Niveau von endogener p53-mRNA in diesen Zellen 5fach höher als in den experimentellen Kontrollen. Die Northern Blots zeigten keinen Beweis für eine Ad5CMV-p53 (DNA)-Verunreinigung der RNA.

**[0148]** Expression von p53-Protein in Adenovirus-infizierten SCCHN-Zellen. Eine Western Blot Analyse wurde zum Vergleich der Konzentrationen an p53-mRNA zu der Menge an produziertem p53-Protein durchgeführt. Eine p53-Bande, die durch den monospezifischen Anti-p53-Antikörper PAb1801 erkannt wurde, wurde in Zellextrakten, die aus sämtlichen Proben isoliert wurden, mit Ausnahme von K562-Zellen, festgestellt. Die Zelllinie 293 zeigte hohe Konzentrationen des p53-Proteins. Proben, die aus falsch infizierten Tu-138- und Tu-177-Zellen infiziert wurden, zeigten niedrige Konzentrationen des p53-Proteins. Das p53-Expressionsniveau blieb demjenigen in den Zellen ähnlich, die mit dem dl312-Adenovirus infiziert waren. Die Konzentrationen an p53-Antigen, die in Ad5CMV-p53-infizierten Zellen nachgewiesen wurden, waren wesentlich höher als die Konzentrationen der endogenen mutierten Proteine in beiden Zelllinien. Dieses Ergebnis zeigt, dass die exogene p53-mRNA, die aus Zellen produziert wurde, die mit Ad5CMV-p53 infiziert waren, effizient in immunreaktives p53-Protein translatiert wird. Außerdem ergab die immunhistochemische Analyse von mit Ad5CMV-p53 infizierten Zellen die charakteristische nukleäre Färbung des p53-Proteins, während mock-infizierte Zellen trotz der Gegenwart des p53-Proteins in diesen Zellen nicht in der Lage waren, eine entsprechende Färbung zu zeigen. Die Unfähigkeit zum Nachweis des Proteins kann zu der Unempfindlichkeit des Tests beitragen.

**[0149]** Wirkung von exogenem p53 auf das SCCHN-Zellwachstum in vitro. Zellen, die mit kontrolliertem dl312-Virus infiziert waren, besaßen Wachstumsgeschwindigkeiten entsprechend demjenigen, der mock-infizierten Zellen ([Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#)), wohingegen das Wachstum der Ad5CMV-p53-infizierten Tu-138- ([Fig. 2A](#)) und Tu-177-Zellen ([Fig. 2B](#)) stark unterdrückt war. 24 h nach der Infektion trat eine scheinbare morphologische Änderung auf, wobei Teile der Zellpopulation sich abrundeten und ihre äußeren Membranen Blasen bildeten. Dies ist Teil einer Reihe von histologisch vorhersagbaren Ereignissen, die den programmierten Zelltod ausmachen. Die Wirkung war in den Tu-138-Zellen vorherrschender als in den Tu-177-Zellen. Zellen, die mit dem replikationsdefekten Adenovirus dl312 infiziert waren, zeigten normale Wachstumsmerkmale, ohne histomorphologische Abnormitäten. Die Wachstumstests waren in vier wiederholten Experimenten reproduzierbar.

**[0150]** Hemmung des Tumorwachstums in vivo. Vier Tiere wurden für jede Zelllinie getestet. Ein Tier in der Tu-177-Gruppe starb nach der zweiten Hautlappenoperation und Durchführung der therapeutischen Eingriffe, vermutlich aufgrund der starken Anästhesie und anschließender Verstümmelung durch die Käfiggenossen. Die Nekropsie ergab keinen Beweis für Metastase oder systemische Auswirkungen. Größenmäßig erkennbare Tumore sind auf beiden hinteren Hautlappen der Tiere zu erkennen (d. h. die Stellen, die kein Ad5CMV-p53 erhielten). Die fehlende Tumorprogression ist in den rechten vorderen Hautlappen der Tiere signifikant, die Ad5CMV-p53 erhielten ( $p < 0,04$ ). Dass Tu-177-Zellen eine langsamere Wachstumsgeschwindigkeit aufweisen, wurde bereits bei diesen Tieren festgestellt. Zwei Tiere in der Tu-138-Gruppe wurden frühzeitig getötet, da sie ein schnelles Wachstum und Ulzeration der Tumor-Kontrollstellen erfuhren. Sämtliche chirurgischen Stellen wiesen entwickelte Läsionen von mindestens  $9 \text{ mm}^3$  vor dem Eingriff auf. Die Tumorvolumina bei der Nekropsie sind in Tabelle 4 gezeigt. Die Unterschiede im Volumen waren in der Tu-177-Gruppe statistisch nicht signifikant, was eine Wiedergabe der begrenzten Probengröße sein kann.

## TABELLIE 4

Wirkung von Ad5CMV-p53 auf das Tumorwachstum in Nacktmäusen<sup>a</sup>

Behandlung	Durchschnittsvolumen	
	[mm <sup>3</sup> ± SEM]	
	Tu-138 (4)	Tu-177 (3)
Ad5CMV- <i>p53</i>	36,0 ± 23,5	19 ± 14,9
Ad5(dl312)	1187,5 ± 419,0	226 ± 84,0
Medium	1909,3 ± 776,8	454 ± 276,8
Signifikanz	p-Wert	p-Wert
<i>p53</i> <sup>b</sup> : dl312	0,04	0,09
<i>p53</i> : Medium	0,05	0,09

<sup>a</sup> Die Zellen wurden subkutan bei  $5 \times 10^6$  Zellen/Hautlappen injiziert. Die Tumogrößen wurden 20 Tage nach der Behandlung bestimmt. Die Nummern in Klammern stellen die Anzahl der bewerteten Tiere dar. <sup>b</sup> Ad5CMV-p53 ist als p53 abgekürzt; dl312 ist eine Abkürzung für Ad5(dl312).

## BEISPIEL 2

In vivo molekulare Therapie mit p53-Adenovirus für residuale Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinome

## Materialien und Methoden

**[0151]** Zelllinien und Kulturbedingungen. Die menschlichen SCCHN-Zelllinien Tu-138, Tu-177, MDA 686-LN und MDA 886 wurden bekanntlich schon früher charakterisiert (Clayman et al., 1993; Sacks et al., 1988). Diese Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (DMEM/F12), angereichert mit 10% Hitze-inaktiviertem fetalem Rinderserum (FBS) und Penicillin/Streptomycin, gezüchtet.

**[0152]** Rekombinante Adenovirusherstellung und -infektion; Zellwachstumstest; Western Blot Analyse. Sämtliche Verfahren wurden bereits in Beispiel 1 beschrieben. Die Zellwachstumstests wurden alle dreifach durchgeführt.

**[0153]** In vivo Transduktion mit β-Galactosidase-Adenovirus. Die X-gal-Färbung der Gewebeproben wurde auf O.C.T.-gefrorenen Gewebeschnitten durchgeführt, um die Transduktionseffizienz zu bestimmen. 8 µm dicke Proben wurden in kaltem PBS gewaschen und in 0,5% Glutaraldehyd bei Raumtemperatur 5 min fixiert. Anschließend wurden die Deckgläser zweimal mit 4°C PBS gewaschen und 4 min X-gal-Lösung (1,3 mM MgCl<sub>2</sub>; 15 mM NaCl; 44 mM Hepes-Puffer pH 7,4; 3 mM Kaliumferricyanid; 3 mM Kaliumferrocyanid; 2% X-gal in DMF) inkubiert. Die Deckgläser wurden mit Hämatoxylin und Eosin gegengefärbt.

**[0154]** Immunhistochemische Analyse. Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete in vivo Tiertestgewebe wurden auf 4–5 µm zerschnitten, bei 60°C getrocknet, deparaffiniert und mit destilliertem Wasser hydratisiert. Anschließend wurden die Schnitte mit 0,5% Saponin in destilliertem Wasser behandelt und in mehreren Wechsel mit destilliertem Wasser gespült; die endogene Peroxidaseaktivität wurde mit 3% Wasserstoffperoxid in Methanol geblockt, gefolgt vom Spülen unter mehreren Wechseln mit destilliertem Wasser. Die Schnitte wurden unter Verwendung eines Sharp Mikrowellenofens, Modell R9H81, der bei einer Frequenz von 2450 MHz bei 700 Watt betrieben wurde, 3 min in destilliertem Wasser Mikrowellen-bestrahlt. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und in PBS übergeführt; immunhistochemische Studien wurden unter Verwendung der Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex(ABC)-Methode von Hsu et al. (1981) folgendermaßen durchgeführt: Die Schnitte wurden mit normalem Pferdeserum geblockt und über Nacht bei 4°C mit Kaninchen-Anti-Human-p53-polyklonalem Antikörper, Klon OM-1, 1:80 (Signet Laboratories, Denham, MA) inkubiert. Sodann wurde ein Anti-Kaninchen-IgG-Elitetestsatz (Vector Laboratories, Burlingame, CA) zur

Anwendung der biotinylierten Anti-Kaninchen-IgG- und ABC-Komplexe verwendet, die jeweils 45 min inkubiert wurden. Die Immunfärbereaktion wurde unter Verwendung von 0,5% DAB in PBS, enthaltend 0,01% Wasserstoffperoxid (pH 7,6) sichtbar gemacht, mit 0,01% Toluidinblau gegengefärbt, dehydriert, geklärt und in Permount fixiert. Zur Verifizierung der Spezifität der Immunfärbereaktion wurde eine Immunperoxidasefärbung unter Anwendung desselben Verfahrens wie bei den Testproben auf einer bekannten Cytospin-positiven Gewebekultur einer Plattenepithelkarzinom-Zelllinie sowie auf einer negativen Kaninchen-monoklonalen Antikörperkontrolle durchgeführt.

**[0155]** Hemmung des Tumorwachstums in vivo. Diese Verfahrensweise wurde durchgeführt, wie in Beispiel 1 beschrieben. Sämtliche Operationsstellen wurden pathologisch sowie durch Nekropsie-Analyse auf systemische Toxizität bewertet.

#### Ergebnisse

**[0156]** Auswirkung von exogenem p53 auf das SCCHN-Zellwachstum in vitro. Beispiel 1 beschrieb die in vitro Hemmung des Zellwachstums durch Ad5CMV-p53 in SCCHN-Zelllinien mit endogenem mutiertem p53. Dieses vorliegende Beispiel soll bestimmen, ob SCCHN-Zelllinien mit endogenem Wildtyp-p53 ähnlich befallen werden würden. Die Auswirkung von Ad5CMV-p53 auf nicht-maligne Fibroblasten wird ebenfalls untersucht.

**[0157]** Für diese Studie wurden vier menschliche SCCHN-Zelllinien ausgewählt. Tu-138 und Tu-177 besitzen ein mutiertes p53-Gen, wohingegen MDA 686-LN und 886 beide homozygot für das Wildtyp-p53-Gen sind. Eine aus dem normalen Fibroblasten-Auswachstum abgeleitete Fibroblastenzelllinie, die karyotypisch normal und nicht-tumorigen ist, wurde als nicht-maligne Kontrollzelllinie verwendet. Zellen, die mit dem Kontrollvirus dl312 infiziert waren, besaßen Wachstumsgeschwindigkeiten ähnlich denjenigen der mock-infizierten Zellen, wohingegen das Wachstum von mit Ad5CMV-p53 infizierten Zellen wesentlich supprimiert war. ([Fig. 3A](#), [Fig. 3B](#), [Fig. 3C](#) UND [Fig. 3D](#)). 24 bis 48 h nach der Infektion trat eine scheinbare morphologische Änderung in sämtlichen Tumorzellen auf, wobei Teile der Zellpopulation abgerundet waren und ihre Außenmembranen Blasen bildeten. Dies sind Teile einer Reihe von histologisch vorhergesagten Ereignissen, die den programmierten Zelltod darstellen. Die Wirkung trat in Zellen mit endogenem mutiertem p53 früher auf als in denjenigen mit Wildtyp p53. Zellen, die mit dem replikationsdefekten Adenovirus dl312 infiziert waren, zeigten normale Wachstumscharakteristika ohne histomorphologische Abnormalitäten. Die Wachstumstests waren in vier wiederholten Experimenten reproduzierbar.

**[0158]** Expression von exogenem p53-Protein in Adenovirus-infizierten normalen Fibroblasten und ihre Auswirkung auf die Wachstumsgeschwindigkeit. Zusätzlich wurde auch die Wirkung des Ad5CMV-p53 auf karyotypisch normale und nicht-tumorige Fibroblastenzelllinien untersucht. Diese Zellen wurden während der Entwicklung von primären Tumorzelllinien isoliert. 24 h nach der Infektion wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt, um die Konzentrationen von Protein zu vergleichen, die durch die verschiedenen infizierten Zelltypen produziert wurden. Eine p53-Bande, die von dem monospezifischen Anti-p53-Antikörper PAb1801 erkannt wurde, wurde in Zellextrakten, die aus sämtlichen Proben isoliert wurden, die mit dem Ad5CMV-p53 infiziert waren, festgestellt. Wie in Beispiel 1 gesehen wurde, zeigte die Zelllinie Tu-138, die mit dem p53-Adenovirus infiziert war, hohe Konzentrationen an p53-Protein nach der Transduktion und diente als Kontrolle. Das p53-Expressionsniveau blieb sowohl in mock-infizierten als auch in dl312 infizierten Zellen ähnlich. Die Ad5CMV-p53-infizierten Fibroblasten zeigten höhere Konzentrationen an p53-Protein als diejenigen der Kontrollzellen. Dieses Ergebnis gibt an, dass das p53-Gen in normale Fibroblasten, die mit Ad5CMV-p53 infiziert waren, wirksam translatiert wird, wie durch die Produktion von immunreaktivem p53-Protein bewiesen. Die Proteinexpressions- und Transduktionswirksamkeit der Cytospins von Ad5CMV-p53-infizierten Fibroblasten wurden durch immunhistochemische Analyse verifiziert. Diese Fibroblastenzelllinie zeigte, unabhängig vom Eingriff (mock-infiziertes, replikationsdefektes Virus oder Ad5CMV-p53) normale Wachstumsgeschwindigkeit und Morphologie ([Fig. 4](#)). Diese Experimente wurden zweimal wiederholt und auch in anderen normalen menschlichen Fibroblastenzelllinien verifiziert.

**[0159]** In vivo Transduktionswirksamkeit. Zum Messen der Wirksamkeit des Gentransfers in vivo wurde der subkutane Hautlappen 72 h nach dem molekularen oder Kontrolleingriff reseziert. Dosis-Antwort-Experimente mit dem Adenovirus-β-Galactosidase-Marker-Vektor zeigen eine Dosis-Antwort-Transduktionswirksamkeit in diesem Modell. Dies wurde durch immunhistochemische Analyse 4 Tage nach der Infektion mit Ad5CMV-p53 bestätigt. Beide Gruppen von Experimenten zeigten eine in vivo Dosis-Antwort, die bereits in vitro beschrieben wurde (Beispiel 1). In keinen Fällen beeinflussten die Virusdosen über  $10^{10}$  PFU die Expression von p53 in anderen Organsystemen, einschließlich Gehirn, Leber, Lunge, Herz, abdominale viszerale Organe und Haut. Diese Experimente erläutern eine Dosis-Antwort-Beziehung zwischen dem viralen Titer und der Transdukti-

onswirksamkeit sowie die Möglichkeit, eine ausgiebige, vorübergehende Expression des transduzierten Gens innerhalb des gewünschten Operationsmodellgebietes zu erreichen.

**[0160]** Suppression des Tumorwachstums in vivo. Studien wurden konzipiert, um zu bestimmen, ob der in vivo Ad5CMV-p53-vermittelte Gentransfer die Entwicklung oder das Wachstum von SCCHN-Zellen, die in einem subkutanen Hautlappen implantiert waren, beeinflussen würde. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde ein mikroskopisches Residualerkrankungsmodell geschaffen. In diesem Modell wurden drei subkutane Hautlappen auf athymischen weiblichen Nacktmäusen aufgeklappt und  $2,5 \times 10^6$  Tumorzellen wurden mit einer Pipette inokuliert. Statt des Zulassens der Knotenbildung durch die Tumorzellen (die im Allgemeinen nach 4 Tagen auftreten), erfolgte eine Einzeldosis mit einer Molekürintervention 48 h nach der Tumorzellen-Inokulation. Auf diese Weise, obwohl keine großen Tumore vorhanden waren, befanden sich mikroskopische Tumorzellen innerhalb der operativen Stelle und simulierten die klinische Zwangslage der operativen Exzision von sämtlichen großflächigen Tumoren nach. Die Entwicklung von Tumoren war direkt mit der Anzahl von Tumorzellen, der für die Implantation zugeteilten Zeit und der Dosis von Ad5CMV-p53 verknüpft. Von den Mäusen, die mikroskopisch implantierte Tumorzellen ( $2,5 \times 10^6$ ) erhielten und mit Ad5CMV-p53 bei  $10^8$  Plaque-bildenden Einheiten (PFU) oder mehr behandelt wurden, entwickelten nur zwei Tumore, beide waren mit der Wildtyp-p53-Zelllinie (MDA 886-LN) implantiert. Sämtliche anderen Zelllinien zeigten eine fehlende Tumorentwicklung (Tabelle 5). Diese Experimente zeigen eindeutig, dass das Wachstum von mikroskopischen Tumorzellen bei Exposition gegenüber Ad5CMV-p53 wirksam in vivo supprimiert werden kann. Die Tumorbildung wurde am Ende eines 12-wöchigen Zeitraums (früherer Tierverlust in den Fällen einer übermäßig großen Tumorlast) durch eine allgemeine und histologische Analyse der Operationsstellen bewertet. Die Daten der Tumorentwicklung sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

TABELLE 5

Wirkung von Ad5CMV-p53 auf die Tumorigenität in einem mikroskopischen Residualerkrankungsmodell für SCCHN

Zelllinie	Behandlung		
	Anzahl der Tumore entwickelnden Mäuse/Mäuse insgesamt		
	Vehikel		
	PBS	dl312	Ad5CMV-p53
Tu-138 (homozygote Mutation p53)	8/8	8/8	0/8
Tu-177 (homozygote Mutation p53)	8/8	8/8	0/8
686-LN (homozygoter Wildtyp p53)	5/8	5/8	0/8
886 (homozygoter Wildtyp p53)	6/6	6/6	2/6

**[0161]** Die immunhistochemische Analyse wurde an den Tumorschnitten von Testtieren durchgeführt. Diese Zelllinie besitzt das Wildtyp-endogene p53-Gen. Bei dem wachstumsfähigen Tumor MDA 686-LN (mock-Infektion) lag eine mangelnde signifikante basaler Immunfärbung vor.  $10^7$  PFU Ad5CMV-p53 zeigten bei der Immunfärbung eine periphere Tumornekrose in dem eher zentralen Teil des Tumors.  $10^8$  PFU Ad5CMV-p53 ergaben bei der Immunfärbung eine Totalnekrose des Tumors, die in der gesamten operativen Tasche festgestellt wurde, wobei mehrere Schichten Protein exprimierten, einschließlich Stroma und oberflächliche Muskelschichten.  $10^9$  PFU Ad5SCMV-p53 zeigen ähnliche Ergebnisse wie  $10^8$  PFU Ad5CMV-p53, allerdings eine erhöhte exogene p53-Expression an der gesamten Operationsstelle, und Ödeme sind vorherrschend.

**[0162]** Unter Verwendung von Tieren, die als ihre eigenen internen Kontrollen dienen, erhöhten Implantate von  $4,0 \times 10^6$  oder mehr Zellen die Entwicklung von subkutanen Implantaten im Vergleich zu der Tumorimplantation von  $2,5 \times 10^6$  Zellen wesentlich ( $P < 0,01$ ), auch bei Behandlung an der Operationsstelle mit Ad5CMV-p53 48 h nach der Inokulation. Wurde eine Entwicklung von 72 oder 96 h der implantierten Zellen vor der Ad5CMV-p53-Intervention zugelassen, erhöhte sich die Tumoraufnahme ebenfalls. Die Dosis-Antwort-Experimente, die bei  $10^8$  und  $10^9$  PFU des Ad5CMV-p53 vorgenommen wurden, waren bei der Hemmung der

Tumorlasten von  $2,5 \times 10^6$  Zellen, die 48 h lang implantiert wurden, gleich wirksam (Fig. 6). Der endogene p53-Status von implantierten Tumorzelllinien (gleich ob homozygotes mutiertes oder Wildtyp-p53) besaß beim Stoppen der Tumorentwicklung wenig Einfluss auf die Wirksamkeit des Ad5CMV-p53.

### BEISPIEL 3

Apoptoseinduktion, die durch den Wildtyp-p53-Adenovirusgen-Transfer in Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinomen vermittelt wird

#### Materialien und Methoden

**[0163]** Zelllinien und Kulturbedingungen; rekombinante Adenovirusherstellung und -infektion. Sämtliche Verfahrensweisen wurden durchgeführt und die Zelllinien gehalten, wie zuvor in den Beispielen 1 und 2 beschrieben.

**[0164]** DNA-Fragmentierungsanalyse. Nach der Inkubation mit dem Wildtyp p53-Adenovirus sowie mit replikationsdefekten Adenoviruskontrollen zu verschiedenen Zeitintervallen wurden die Zellen geerntet, in 300 µl PBS unter Zugabe von 3 ml Extraktionspuffer (10 mM Tris, pH 8,0, 0,1 M EDTA, 20 µg/ml RNase, 0,5% SDS) resuspendiert und bei 37°C 1–2 h inkubiert. Am Ende der Inkubation wurde Proteinase K bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt und die Lösung für mindestens 3 h in ein 50–°C-Wasserbad verbracht. Die DNA wurde einmal mit einem gleichen Volumen von 0,5 M Tris (pH 8,0)-gesättigtem Phenol extrahiert, und so dann wurde die Extraktion mit Phenol/Chloroform wiederholt. Die präzipitierte DNA wurde in 1% Agarosegel analysiert.

**[0165]** Zellfixierung. Für das TUNEL-Verfahren wurden die Zellen in 1% Formaldehyd in PBS (pH 7,4) 30 min auf Eis fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen, in 70% eiskaltem Ethanol resuspendiert und bis zur Verwendung bei –20°C aufbewahrt. Für die Zellzyklusanalyse wurden die Zellen nur in 70% eiskaltem Ethanol fixiert.

**[0166]** Terminaler Desoxynucleotidyltransferasetest. Der Test wurde nach dem Verfahren von Gorczyca et al. (Gorczyca et al., 1993) durchgeführt. Kurz gesagt, wurden die Zellen nach Fixierung und Waschen in 50 µl TdT-Puffer, enthaltend 0,2 M Natriumcacodylat (pH 7,0), 2,5 mM Tris-HCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), 0,1 mM DTT (Sigma Chemical Company), 0,25 mg/ml BSA (Sigma Chemical Company), 5 Einheiten terminale Transferase (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) und 0,5 nmol Biotin-16-dUTP zusammen mit dATP, dGTP und dCTP in einer Konzentration von 20 µM resuspendiert. Die Kontrollen wurden durch Inkubation eines separaten Aliquots von jeder Testprobe ohne d-UTP hergestellt. Die Zellen wurden bei 37°C 30 min in der Lösung inkubiert, in PBS gespült und in 100 µl FITC resuspendiert, wobei die Färbelösung 4 × SSC, 0,1% Triton X-100 und 2,5 µg/ml fluoresziertes Avidin (Vector Labs. Inc., Burlingame, CA) enthielt. Die Röhrchen wurden 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden in PBS mit 0,1% Triton X-100 gespült und in 0,5 ml PBS, enthaltend Propidiumiodid (5 µg/ml) und 70 µl (1 mg/ml) RNase, resuspendiert. Die Röhrchen wurden im Dunkeln auf Eis 30 min vor der Durchflusszytometrieanalyse inkubiert.

**[0167]** Durchflusszytometrieanalyse. Sämtliche Proben wurden unter Verwendung eines EPICS-Profile II Flow-Cytometers (Coulter Corp., Hialeah, FL) mit der optischen Standardkonfiguration analysiert. Mindestens 5000 Ereignisse wurden für jede Probe gesammelt. Die Positivität für TdT-Endmarkierung wurde durch Subtraktion des Kontrollhistogramms von dem Testhistogramm unter Anwendung des Immun-4-Programms der Elite-Workstationware (Coulter Corp., Hialeah, FL) bestimmt.

**[0168]** Zellwachstumstest. Die Zellen wurden ausgepflanzt, und das Wachstum wurde überwacht, wie in Beispiel 1 beschrieben.

**[0169]** In vivo Analyse der Apoptose. Die Gentherapie in einem mikroskopischen Residualerkrankungsmodell von SCCHN wurde bereits vorstehend in Beispiel 2 beschrieben.

**[0170]** In situ Endmarkierung. Die Verfahrensweise wurde wie bereits beschrieben (Wijsman et al., 1993) durchgeführt. Kurz gesagt, wurden Paraffinschnitte in Xylol jeweils dreimal 5 min entwachst und schrittweise durch Eintauchen der Deckgläser jeweils 3 min in 100%, 90%, 70% und 30% Ethanollösungen hydratisiert. Die endogene Peroxidase wurde durch Eintauchen der Deckgläser für 20 min in 0,75% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Vol./Vol. in 100% Methanol inaktiviert. Nach dem Waschen der Deckgläser mit PBS wurden die Schnitte mit 0,1% Pep-

sin (Fisher Scientific, Houston, TX) Gew./Vol. in 0,1 N HCl 5 min bei 37°C verdaut und ausgiebig in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte 1 h bei 37°C in einer Feuchtkammer mit einem Endmarkierungscocktail inkubiert, der folgendes einschließt: 0,5 Einheiten/µl terminale Deoxynucleotidyltransferase, 0,06 mM biotinyliertes dUTP, 10 µl 5 × tdt-Puffer, zweifach destilliertes Wasser bis auf 50 µl. Die Reaktion wurde durch Eintauchen der Deckgläschen in einen Puffer, enthaltend 300 mM NaCl und 30 mM NaCitrat in doppelt destilliertem Wasser, beendet. Nach dem Waschen der Deckgläschen in PBS wurden die Schnitte mit Meerrettich-peroxidase-konjugiertem Avidin 1 h bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Das Färben wurde unter Verwendung von 3,3'-Diaminobenzidin entwickelt und die Schnitte wurden mit Methylgrün gegengefärbt.

### Ergebnisse

**[0171]** Wachstumssuppression von SCCHN-Zelllinien durch p53-Adenovirus. Die vorstehenden Beispiele zeigen, dass das Wildtyp-p53-Gen durch einen rekombinanten adenoviralen Vektor wirksam in SCCHN-Zelllinien transduziert werden kann. Folglich verlieren die betroffenen Tumorzellen ihre Fähigkeit zur Proliferation in vitro sowie in vivo. Die Suppressionswirkung ist von dem endogenen p53-Status der Zelllinien unabhängig. Die Auswertungen der bisherigen Wachstumsgeschwindigkeit wurden in einem einwöchigen Abstand durchgeführt. Das vorliegende Beispiel untersucht die frühen Auswirkungen des Wildtyp-p53 auf das SCCHN-Zellwachstum (d. h. die früheren Zeitintervalle, Stunden).

**[0172]** Bei dieser Studie wurden zwei repräsentative Zelllinien verwendet. Die Zelllinie Tu-138 beherbergt ein mutiertes p53-Gen, wohingegen die Zelllinie MDA 686-LN ein Wildtyp-p53-Gen besitzt. Zellen, die mit dem replikationsdefekten Virus dl312 infiziert waren, besaßen Wachstumsgeschwindigkeiten, entsprechend denjenigen der mock-infizierten Zellen ([Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#)). Andererseits war das Wachstum der Ad5CMV-p53-infizierten Tu-138-Zellen ([Fig. 5A](#)) und der MDA 686-LN-Zellen ([Fig. 5B](#)) signifikant unterdrückt. Es war offensichtlich, dass das exogene p53-Protein eine frühere und tiefgreifendere Wachstumssuppression der Tu138 im Vergleich zu MDA 686LN aufwies. Es wurde eine offensichtliche morphologische Änderung festgestellt, wobei sich Teile der Zellpopulationen abrundeten und ihre Außenmembranen Bläschen bildeten, entsprechend der Apoptose, die gleichzeitig mit dem Start der Wachstumssuppression auftrat. Zellen, die mit dem replikationsdefekten Adenovirus dl312 infiziert waren, zeigten normale Wachstumsmerkmale, ohne histomorphologische Abnormalitäten. Wichtigerweise wurden diese Wirkungen nicht nach der p53-Adenovirusinfektion von karyotypisch normalen Fibroblasten, wie vorstehend in Beispiel 2 ausgeführt, sowie in menschlichen oralen Keratinozyten (immortalisiert, allerdings nicht tumorigen) festgestellt.

**[0173]** DNA-Fragmentierungsanalyse. Einer der charakteristischen Marker bei der Apoptose, der sich von der Nekrose unterscheidet, ist das biochemisch feststellbare Auftreten des Bandenmusters von DNA-Fragmenten. Zur Bestätigung der Feststellung, dass die Zellen nach der p53-Adenovirusinfektion eine Apoptose erfahren haben, wurde eine Analyse der durchgeführten DNA-Fragmentierung durchgeführt. Chromosomale DNA, die nach der Infektion mit dem replikationsdefekten oder dem Wildtyp p53-Adenovirus aus den überlebensfähigen Zellen extrahiert wurden, wurden einer Agarosegelektrophorese unterzogen. Das Auftreten von DNA-Fragmenten, entsprechend bis ungefähr 200 bp und ihren Mehrfachen, wurde in beiden Zelllinien festgestellt. Die fragmentierte DNA trat 22 h nach der p53-Adenovirusinfektion in Tu-138-Zelllinien auf, wohingegen in den MDA 686-LN-Zelllinien die fragmentierte DNA nach 30 h sichtbar und 48 h nach der Wildtyp-p53-Adenovirusinfektion offensichtlicher war. Aus den mock-infizierten und aus den dl312 infizierten Zellen tauchte keine nachweisbare fragmentierte DNA auf.

**[0174]** In vitro terminaler Desoxynucleotidyltransferase-Test. Ein weiterer charakteristischer Marker der Apoptose ist die morphologische Änderung und Zerstörung der strukturellen Organisation des Nukleus, was zu einer Chromatinkondensation führt. Zum Nachweis einer solchen ultrastrukturellen Änderung wurde die Elektronenmikroskopie ausgiebig eingesetzt. Allerdings haben neuere Durchfluszytometrieverfahren zur Identifizierung von apoptotischen Zellen aufgrund der Fähigkeit, zelluläre Populationen zu scannen und zu analysieren, verglichen mit der Elektronenmikroskopie (Gorczyca et al., 1993), den Vorzug gewonnen. Der Erfinder setzte das TUNEL-(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling)-Verfahren (Gorczyca et al., 1993) ein, welches auf dem Nachweis von erheblichen DNA-Brüchen beruht, um die apoptotischen Zellen nachzuweisen. 15 h nach der p53-Adenovirusinfektion befanden sich 4,4% der lebensfähigen Tu-138-Zellpopulation in apoptotischen Stadien, im Vergleich zu keinen Zellen von MDA 686-LN ([Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#)). Die Anzahl von apoptotischen Zellen stieg proportional an, wenn auch die Dauer der Beobachtung nach der p53-Adenovirusinkubation verlängert wurde. Nahezu 31% der Tu-138-Zellen durchliefen nach 22 h die Apoptose. Obwohl verzögert in der anfänglichen Induktion der Apoptose, befanden sich ungefähr 60% der MDA 686-LN-Zellen 48 h nach der p53-Adenovirusinfektion in apoptotischen Stadien. Bemerkenswerterweise kann der Prozentsatz von apoptotischen Zellen, wie durch das TUNEL-Verfahren bestimmt, signifikant unter-

schätzt werden, da die Analyse nur mit überlebensfähigen Zellen durchgeführt wurde. Diese Daten korrelierten gut mit der Wachstumsgeschwindigkeit- und DNA-Fragmentierungsanalyse. Es existierte keine nachweisbare Zellpopulation, die in Kontrollexperimenten unter Anwendung einer mock-Infektion sowie von replikationsdefekten Viruskontrollen (100 M.O.I.) eine Apoptose durchlief. Darum war die Apoptose keine Funktion von transduzierten adenoviralen Genprodukten an sich.

**[0175]** In vivo Analyse der Apoptose. Die vorstehenden Beispiele zeigen, dass das p53-Adenovirus die Tumorbildung in vivo unterdrückt. Dieses Beispiel war dazu ausgelegt zu zeigen, ob die Suppression des Tumorzwachstums in vivo die Folge der Apoptose war. Eine *in situ* Endmarkierungsanalyse wurde zum Nachweis apoptotischer Zellen in Paraffin eingebetteten Schnitten, die aus Beispiel 2 erhalten wurden, durchgeführt. Eindeutig wurde keine Färbung in den Gewebeschnitten festgestellt, die aus MDA 686LN-tragenden Tieren isoliert wurden, welche als Kontrolle eine PBS-Behandlung erhalten hatten. Andererseits zeigten Gewebeschnitte, die aus MDA 686LN-tragenden Mäusen isoliert wurden, die mit dem Wildtyp p53-Adenovirus behandelt wurden, eine stark positive Färbung, was zeigt, dass die Apoptose tatsächlich das an der Suppression des Tumorzwachstums in vivo beteiligte Ereignis war.

**[0176]** Weiterhin war der Erfinder bezüglich dieser Studien bestrebt zu bestimmen, ob die Wachstumssuppression teilweise auf dem Anhalten des Zellzyklus durch das induzierte p21-Protein beruht oder hauptsächlich ein Ergebnis der Apoptose ist. Westernblotting zeigte, dass das p21-Protein in den Wildtyp-p53-Adenovirus-infizierten SCCHN-Zellen induziert war. Allerdings ergaben die Zellzyklusanalysen, dass trotz der erhöhten Konzentration an p21-Protein in den p53-Adenovirus-infizierten Zellen, im Vergleich zu der S-Phase, keine nennenswerte Akkumulation von Zellen im G<sub>1</sub>-Zustand existierte.

#### BEISPIEL 4

Wachstumssuppression von Kof- und Hals-Plattenepithelzellen durch p53-FLAG: ein wirksamer Marker für Wege in der Gentherapie

Materialien und Methoden.

**[0177]** Zelllinien und Kulturbedingungen. Rekombinante Adenovirus-Herstellung und -Infektion; Northern Blot Analyse; Western Blot Analyse; Zellwachstumstest, Immunhistochemische Färbung *in vitro* von Zellschichten. Sämtliche Verfahrensweisen wurden durchgeführt, wie in Beispiel 1 beschrieben, und die Zelllinien gehalten, wie in Beispiel 1 beschrieben.

**[0178]** Generierung des p53-FLAG-Adenovirus. Die p53-cDNA-Sequenz wurde aus dem pC53-SN durch Verdau mit BamHI ausgeschnitten und in die BamHI-Schnittstelle von pGEM7Z kloniert. Ein rekombinantes Plasmid mit der ordnungsgemäßen Insertorientierung wurde anschließend mit Acc1 und Kpn1 zur Entfernung von 22 Aminosäuren vom 3'-Ende der p53-cDNA verdaut. Ein Linker mit Acc1-Kpn1-kompatiblen Enden, der die Sequenz des FLAG-Peptids einschließlich eines Stoppkodons enthielt, wurde sodann in das verdaute Plasmid ligiert, um das p53-FLAG-Fusionsgen zu erzeugen. Das resultierende p53-FLAG-Fusionsgen wurde anschließend in einen Expressionsvektor mit dem menschlichen CMV-Promotor und dem SV-Polyadenylierungssignal kloniert. Anschließend wurde das Endkonstrukt in einen Shuttle-Vektor pXCJL.1 (Zhang et al., 1994) inseriert, um ein rekombinantes p53-FLAG-Adenovirus zu generieren.

**[0179]** In vivo mikroskopische Residualerkrankungsexperimente. Die Studien wurden in einer definierten pathogenfreien Umgebung unter Verwendung des athymischen Nacktmäusemodellsystems, das in Beispiel 1 beschrieben ist, durchgeführt. Zwei verschiedene Serien von wiederholten Experimenten wurden durchgeführt. Das erste war ein Dosis-Antwort-Experiment unter Verwendung des AdCMV-p53-FLAG-Virus in drei der vier Hautlappen in absteigenden Konzentrationen ( $10^{10}$  PFU,  $10^9$  PFU,  $10^8$  PFU). Der vierte Hautlappen diente als Kontrolle und wurde entweder gegenüber PBS oder dem replikationsdefekten Adenovirus (DL312) randomisiert. Die zweite Studie wurde unter Verwendung von  $10^{10}$  PFU AdCMV-p53-FLAG, AdCMV-p53 und des replikationsdefekten Adenovirus in drei getrennten Hautlappen durchgeführt. Der vierte Hautlappen wurde mit dem gleichen Volumen (100 µl) steriles PBS angeimpft. 48 h nach der Behandlung wurden zwei von diesen Tieren getötet, und die Hautlappen wurden zur immunhistochemischen Analyse geerntet. Die restlichen Tiere wurden 21 Tage beobachtet und anschließend getötet. Die Tumorvolumina wurden unter Verwendung einer Mikrometerschraube zum Vergleich gemessen.

## Ergebnisse

**[0180]** Expression von mRNA nach Infektion mit dem AdCMV-p53- und AdCMV-p53-FLAG-Virus. Sowohl Tu-138 als auch MDA 686-LN wurden auf die Expression von p53-mRNA untersucht. Die Gesamt-RNA wurde nach der Adenovirusinfektion isoliert. Eine Northern Blot-Analyse wurde durchgeführt. zwischen den AdCMV-p53- und AdCMV-p53-FLAG-infizierten Zellen wurden ähnliche Konzentrationen an exogener AdCMV-p53-mRNA nachgewiesen. Das Niveau der p53-mRNA-Expression nach der Infektion mit AdCMV-p53 und AdCMV-p53-FLAG war für Tu-138 und für MDA 686-LN vergleichbar. Eine Intensitätsschwankung hängt offenbar mit der Beladungsdosis zusammen. Die endogene Expression von p53-mRNA ist in den Spuren 2 und 3 in der mutierten p53-Zelllinie Tu-138 zu sehen. Es existierte keine signifikante endogene p53-mRNA-Expression in der MDA 686-LN-Zelllinie, die für das p53-Gen der Wildtyp ist. Diese Daten legen nahe, dass das AdCMV-p53-FLAG-Virus, wie das AdCMV-p53-Virus, erfolgreich transduziert und effizient transkribiert wird. Die Northern Analyse ergab keinen Beweis für eine AdCMV-p53-DNA-Verunreinigung.

**[0181]** Expression von endogenem p53-Protein in AdCMV-p53- und AdCMV-p53-FLAG-infizierten SCCHN-Zelllinien. Es wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt, um die Menge an Protein, die durch die AdCMV-p53-infizierten und die AdCMV-p53-FLAG-infizierten Zellen exprimiert wurde, zu vergleichen. Die Proteinbändern wurden unter Verwendung des monospezifischen p53-Antikörpers (PAb1801) und des Anti-FLAG-M2-Antikörpers (IB13025) auf zwei gleichzeitig laufen gelassenen Gelen identifiziert. Unter Verwendung des p53-Antikörpers (pAB1801) wurde in beiden Zelllinien, die mit dem AdCMV-p53 und dem AdCMV-p53-FLAG infiziert wurde, ein ähnlich hohes Niveau der p53-Proteinexpression festgestellt. Die Tu-138 und MDA 686-LN-Zellen, die mit dem AdCMV-p53 infiziert waren, wurden ebenfalls getestet. Es wurde keine Änderung in der p53-Proteinexpression in beiden der replikationsdefekten Adenovirus-infizierten Zellen oder in der mock-Infektionsgruppe festgestellt. Wurde ein ähnlich behandeltes Gel, das mit dem Maus-Anti-FLAG-M2-Antikörper sondiert wurde, behandelt, schien das Niveau der p53-FLAG-Proteinexpression ähnlich demjenigen zu sein, das nach der p53-Antikörpersondierung exprimiert wurde, allerdings wurde keine nachweisbare Bande in den Zellen festgestellt, die mit dem AdCMV-p53-Virus infiziert waren. Die mock- und DL312-infizierten Zellen zeigten keine nachweisbare Konzentration des immunaktiven p53- oder FLAG-Proteins in einer der beiden Zelllinien.

**[0182]** Wirkung von AdCMV-p53 und AdCMV-p53-FLAG auf das SCCHN-Zellwachstum in vitro. Die cytotoxische Wirkung der Wildtyp-p53-Therapie in Tu-138- und MDA 686-LN-Zelllinien wurde vorstehend ausführlich behandelt. Die Tu-138-Zelllinie besitzt ein endogen mutiertes p53-Gen, und die MDA 686-LN-Zelllinie besitzt das Wildtyp-p53-Gen. Diese Studie ist bestrebt zu bestimmen, ob nach Rekombination des AdCMV-p53-Virus durch Inserieren der FLAG-Sequenz ein Unterschied in der Wirksamkeit festgestellt werden könnte.

**[0183]** Zellen, die mit dem replikationsdefekten Adenovirus infiziert waren, besaßen eine ähnlich Wachstums geschwindigkeit, wie die mock-infizierten Zellen. Eine milde cytotoxische Wirkung konnte mit dem replikations defekten Adenovirus festgestellt werden (Fig. 7A). Im Gegensatz dazu erfuhren diejenigen Zellen, die entweder mit dem AdCMV-p53 oder AdCMV-p53-FLAG infiziert waren, innerhalb von drei Tagen praktisch einen totalen Tumorzellentod. Die histologische Untersuchung ergab Bläschenbildung durch die Plasmamembran, was das charakteristische Merkmal der Apoptose ist und als Mechanismus des Zelltods in AdCMV-p53-infizierten SCCHN-Zelllinien gekennzeichnet wurde (Beispiel 1). Wie vorstehend ausgeführt, war die Wirkung für die Tu-138-Zelllinie (mutiertes p53) hervorstechender als für die MDA 686-LN-Zelllinie (Wildtyp p53). Wachstums kurventests waren in drei wiederholten Studien reproduzierbar, ohne dass ein signifikanter Unterschied zwischen der Wirkung der AdCMV-p53- und der AdCMV-p53-Viren festgestellt wurde, was nahe legt, dass die Zuge gabe des FLAG-Peptids die Fähigkeit von p53 zur Suppression des Zellwachstums nicht beeinflusste.

**[0184]** Immunhistochemische Färbung der mit dem Adenovirus infizierten SCCHN-Zelllinien. Infizierte Zell monoschichten wurden unter Anwendung von immunhistochemischen Standardtechniken auf die Expression des p53- und des p53-FLAG-Proteins verglichen. Weder das p53- noch das FLAG-Protein konnten eindeutig in der mock-Infektion von DL312-infizierten Zellen in der MDA-686-LN-Zelllinie identifiziert werden. Allerdings war in Tu-138, welche ein mutiertes p53-Gen besitzt, die endogene Färbung für p53 positiv. Wenn die Zellen mit dem AdCMV-p53-Virus infiziert waren, wurde in beiden Zelllinien eine starke Färbung festgestellt. Die Sichtinspektion dieser mit dem AdCMV-p53-PLAG-Virus infizierten Zellen zeigte eine identische Intensität der Färbung und eine Anzahl von positiven Zellen mit PAb1801 als Antikörper, im Vergleich zu den mit dem AdCMV-p53-Virus infizierten Zellen. Die mit dem AdCMV-p53-PLAG-Virus infizierten Zellen zeigten auch eine starke immunhistochemische Positivität mit dem M2-FLAG-Antikörper. Die Qualität der Färbung war sowohl innerhalb des Nukleus als auch zu einem geringeren Ausmaß im Zellzytoplasma verschieden.

**[0185]** In vivo Wachstumssuppression. Dosis-Antwort-Studien unter Verwendung von  $10^8$ ,  $10^9$  und  $10^{10}$  plaquebildenden Einheiten (PFU) des AdCMV-p53-FLAG-Virus im Vergleich zu einem Kontrollhautlappen, der entweder PBS oder DL312 war, wurden unter Anwendung des in Beispiel 1 beschriebenen mikroskopischen Modellverfahrens an der Tu-138-Zelllinie durchgeführt. Die mittlere Tumogröße für die mock-Infektion betrug  $1205 +/− 205 \text{ mm}^3$ . Die Tumogröße nahm linear mit zunehmender Konzentration an Virus, das bei dem molekularen Eingriff verwendet wurde, ab. Die mittlere Tumogröße betrug  $637 +/− 113 \text{ mm}^3$ ,  $392 +/− 109 \text{ mm}^3$  und  $193 +/− 74 \text{ mm}^3$  für diejenigen Hautlappen, die mit  $10^8$ ,  $10^9$  bzw.  $10^{10}$  PFU des AdCMV-p53-FLAG behandelt wurden. Jedes Tier wurde unter Anwendung eines gepaarten t-Tests mit sich selbst verglichen, und es wurde ein signifikanter Dosis-Antwort-Effekt bei  $p < 0,05$  bei allen Vergleichen festgestellt, außer zwischen den mit  $10^9$  und  $10^{10}$  PFU behandelten Hautlappen. Eindeutig ist die visualisierte Tumorwachstumsinhibition umso größer, je größer die Menge an Virus, ist. In einer zusätzlichen Studie wurden die Auswirkungen von AdCMV-p53 mit denjenigen des AdCMV-p53-FLAG verglichen. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Aktivität festgestellt.

**[0186]** Immunhistochemische Demonstration der exogenen Tumorsuppressionswirkung in dem mikroskopischen Residualerkrankungstiermodell. Nachdem sich die in vitro und in vivo Aktivität des AdCMV-p53- und des AdCMV-p53-PLAG als vergleichbar herausgestellt hat, wendete der Erfinder immunhistochemische Techniken an, um das p53-Plaquefusionsproteinprodukt in vivo zu zeigen. Unter Verwendung der Tu-138- und der MDA 686-LN-Zelllinien wurden Hautlappen mit mikroskopischer Residualerkrankung 48 h nach der Behandlung geerntet, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Durch das Danebenlegen von Schnitten von Tumorzellen, die mit dem AdCMV-p53-FLAG-Virus behandelt wurden, wurde die Färbung sowohl für das p53- als auch das FLAG-Protein angewandt. Die Färbungsintensität und die Anzahl von Zellen, die sich positiv färben, waren direkt proportional zu der bei der Infektion angewandten Menge an Virus. Die Kontrollen waren bei der Färbung sowohl mit p53- als auch mit FLAG-Antikörpern in den MDA 686-LN-Zellen negativ. Eine endogene Färbung für p53 wurde in den Tu-138-Tumorzellen festgestellt. Eine histologische Probe färbte den p53-Antikörper und den FLAG-Antikörper mit Hämatoxilin und Eosin. Die charakteristische Zytoplasmafärbung mit dem FLAG-M2-Antikörper kontrastierte mit der intranukleären Färbung des p53-Antikörpers. Dies ist das erste Mal, dass sich der FLAG-M2-Antikörper auf Paraffin eingebettetem fixiertem Gewebe als wirksam erwiesen hat. Die Färbung zeigte, dass die tumorsuppressive Wirkung durch die exogene Therapie gesteuert wird und dass in einem in vivo Modell die exogene Therapie unter Anwendung des eingesetzten FLAG-Systems identifiziert werden kann.

**[0187]** Schlussfolgernd ist klar, dass die gemeinsame Verabreichung des FLAG-Proteins zusammen mit der gewünschten Gentherapie eine potentielle Anwendbarkeit als gentherapeutischer Marker bietet. Diese Erfindung zeigt eindeutig, dass es gleichzeitig zusammen mit dem p53-Gen beschleunigt wurde und dass die Expression der Messenger-RNA und Proteins nicht abnahm. Was noch wichtiger ist, wurde die biologische Aktivität des verabreichten Tumorsuppressorgens nicht geändert. Der FLAG-Antikörper hat sich zum ersten Mal als wirksam erwiesen, wenn eine immunhistochemische Analyse auf Formalin-fixiertem Paraffin eingebettetem Gewebe durchgeführt wird. Diese Faktoren legen die Brauchbarkeit dieses neuen Proteins als Tracer in weiteren Gentherapiestudien nahe.

## BEISPIEL 5

Behandlung des Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinoms unter Verwendung des p53-Adenovirus

Patient A

**[0188]** Ein 53 Jahre alter männlicher Patient weist einen inoperablen SCCHN-Tumor des Kopfes auf. Die Tumormasse beträgt etwa 6,5 cm im Durchmesser. Nach Untersuchung der Knochenmarksfunktion, der Plättchen-Anzahl und der Nierenfunktion erhält der Patient eine erste Behandlung mit  $10^8$  infektiösen Partikeln eines Adenovirus-p53-Expressionskonstrukts, verdünnt in steriler Phosphat-gepufferter Salzlösung, über 8 discrete intratumorale Injektionen (Gesamtvolumen 10 ml). Alle drei Tage erhält der Patient eine identische Behandlung, bis insgesamt 6 Behandlungen verabreicht wurden.

**[0189]** Drei Tage nach der sechsten Behandlung wird der Tumor untersucht, und es wird festgestellt, dass der Durchmesser  $> 4,0 \text{ cm}$  ist. Die histologische Untersuchung zeigt eine beträchtliche Zellfragmentierung am Tumorrand. Ein zweiter Durchlauf von sechs Behandlungen wird vorgenommen, wonach festgestellt ist, dass der Tumor  $> 2,0 \text{ cm}$  im Durchmesser und nekrotisch ist. Der Patient erhält weiterhin drei Monate lang einmal wöchentliche Behandlungen, wonach der Tumor nicht länger sichtbar ist.

## Patient B

**[0190]** Eine 44 Jahre alte Patientin mit einem operablen SCCHN-Tumor des Halses. Die Tumormasse beträgt ungefähr 2,5 cm im Durchmesser. Nach der Untersuchung der Knochenmarksfunktion, der Plättchen-Anzahl und der Nierenfunktion erhält die Patientin eine erste Behandlung mit  $5 \times 10^7$  infektiösen Partikeln eines Adenovirus-p53-Expressionskonstrukts, verdünnt in steriler Phosphat-gepufferter Salzlösung, über 3 distinkte intratumorale Injektionen (Gesamtvolumen 3 ml). Alle drei Tage erhält die Patientin eine identische Behandlung, bis insgesamt 6 Behandlungen verabreicht wurden.

**[0191]** Drei Tage nach der sechsten Behandlung wird der Tumor herausgeschnitten. Das Tumorbett wird 60 min in 6 ml steriler Phosphat-gepufferter Salzlösung gespült. Das Inokulum wird entnommen, die Wunde wird verschlossen, und in dem Tumorbett wird ein Drain belassen. An den Tagen 4, 7, 10 und 14 nach dem Eingriff werden  $5 \times 10^7$  infektiöse Partikel eines Adenovirus-p53-Expressionskonstrukts, verdünnt in steriler Phosphat-gepufferter Salzlösung (Gesamtvolumen 3 ml), über den Drain diffundiert. Nach 2 h Kontaktieren des Tumorbettes wird das Inokulum durch Absaugen entfernt. Sechs Monate nach Beendigung der Behandlung werden keine primären lokalen oder regionalen Tumore festgestellt.

## BEISPIEL 6

Wildtyp p53-Gentransfer über einen adenoviralen Vektor in einem Phase-I-Versuch mit Patient mit fortgeschrittenen rekurrenten Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinomen

**[0192]** Ein adenoviraler Vektor, der das normale "Wildtyp"-p53-Gen enthält, wurde in logarithmisch ansteigenden Dosen an Patienten mit Biopsie-bestätigten rekurrenten Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals abgegeben. Die direkten tumoralen Injektionen wurden dreimal wöchentlich während zwei aufeinander folgenden Wochen durchgeführt. Die Patienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt: 1) resektierbare rekurrente Erkrankung, 2) unresektierbare rekurrente Erkrankung.

**[0193]** Mit denjenigen Patienten, die in die resektierbare Erkrankungsgruppe eingeteilt waren, wurde eine allgemeine chirurgische Gesamtresektion ihrer rekurrenten Neoplasmen 72 h nach dem sechsten Gentransferereignis während eines zweiwöchigen Zeitraums durchgeführt. Der Adenovirusvektor wurde ebenfalls intraperitoneal und 72 h nach dem Operationsvorgang über eine Rücklaufkatheterinfusion abgegeben. Die unresektierbaren Patienten wurden monatlich während zweiwöchiger Cyclen wiederholten Gentransferversuchen über direkte Tumorinjektionen ausgesetzt, bis die Krankheitsprogression oder Verschlimmerung des Leistungszustandes des Patienten festgestellt wurde. Die Sicherheit dieser Behandlung wurde durch sorgfältige Beobachtung in der Klinik, Biopsien zur Bewertung der Gentransfereffizienz, der Körperflüssigkeitsanalyse für die abgegebenen Vektoren und durch Nekropsieanalyse überwacht.

## Methoden

**[0194]** Untersuchungsobjekte. 21 Patienten mit fortgeschrittenen rekurrenten Plattenepithelkarzinomen des oberen Luftröhren-Verdauungstrakts mit einem Leistungsstatus 2 gemäß Eastern Cooperative Oncology Group wurden einem von zwei Studienzweigen zugeordnet, bestehend aus Patienten mit resektierbaren (Gruppe 1) oder nicht-resektierbaren (Gruppe 2) rekurrenten Malignitäten. Die Merkmale der Studienobjekte und die Dosierung des adenoviralen Vektors sind in den Tabellen 6 bzw. 7 gezeigt. Bei sämtlichen Frauen war der Schwangerschaftstest negativ, und alle Patienten wendeten Verhütungsmethoden an. Die Zustimmung nach einer Information wurde von sämtlichen Patienten vor dem Eintritt in die Studie erhalten.

**[0195]** Gentransfervektor. Die vorliegende Studie verwendete einen replikationsdefekten Adenovirus-Serotyp-5-Vektor mit einem Enhancer-(Cytomegalovirus)-Promotor, der als Ad5CMV-p53 bezeichnet wurde. Drei Chargen von Adenovirusvektor mit plaquebildenden Einheiten (PFU) im Bereich von  $10^9$  bis  $10^{11}$  wurden gemäß guter Herstellungspraktiken bei der Firma Magenta, Inc. und Introgen Therapeutics, Inc. hergestellt und tiefgefroren ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) zur University of Texas, M. D. Anderson Cancer Center verschifft. Jede Charge war unter Anwendung von Western Blots sowie von in vitro Tumorzellensuppressionswachstumstests transduktionswirksam. Der Vektor wurde aufgetaut und unmittelbar vor dem Gentransfer in Phosphatgepufferter Salzlösung (Ve-hikel) verdünnt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  in die Räume der Patienten gebracht.

**TABELLE 6**  
**Patientenmerkmale**

• Patien- t Nr.	• Alte- r	• Geschle- cht	• primärer Krebs	• Pathologi- e	• p53- Genoty- p	• bishergige fehlgeschlage- ne	• Stelle des Gentransfers	• *Studie n- zweig
• 1	• 31	• F	• Mundbode n	• Moderat • diff. SCC	• MAA	• Operation, Röntgen,	• Gesichtsmasse	• 1
• 2	• 58	• M	• Larynx	• Moderat • diff. SCC	• WT	• Operation, Röntgen	• Submentalmasse e,	
• 3	• 56	• M	• Pyriform • Sinus	• schlecht diff.	• MAA	• Operation, Röntgen	• Nasopharynx linke Halsmasse	• 2
• 4	• 42	• F	• Zungenbas is	• schlecht diff.	• WT	• Operation, Röntgen	• rechte Halsmasse	• 2

• Patien- nt Nr.	• r	• Alte- ht	• Geschle- cht	• primärer Krebs	• Patholog- ie	• p53- Genoty- pe	• bisherige fehlgeschlage- ne	• Stelle des ne	• *Studie n-
• 5	• 71	• M	• unbekannt	• schlecht	• WT	• Operation, Röntgen	• linke	• 1	
• 6	• 43	• M	• cervikal, • Ösophagus	• schlecht	• MAA	• Operation, Röntgen,			
• 7	• 63	• M	• Zunge	• moderat	• WT	• Röntgen, Chemo	• linke	• 2	
• 8	• 46	• M	• Zungenbas- is	• diff. SCC	• MAA	• Operation, Röntgen	• Halsmasse		
• 9	• 57	• M	• Larynx	• gut diff.	• WTT	• Operation, Röntgen	• Zungenbasis	• 1	
				• SCC			• peristomal	• 2	
							• Rekurrenz		

Tabelle 6 (Fortsetzung):

• 10	• 58	• M	• Larynx	• moderat	• MAA	• Operation,	• hypopharyngea	• 1	• Therapien
• 11	• 46	• M	• Zungenbasis	• schlecht	• MAA	• Röntgen,	• Zungenbasis	• 1	• Röntgen le Masse
• 12	• 57	• F	• Mundboden	• moderat	• WT	• Operation,	• linker	• 2	• SCC diff. diff.
• 13	• 66	• M	• Zungenbasis	• moderat	• WT	• Operation,	• Röntgen retromolarer	• 2	• diff. SCC diff. SCC
• 14	• 48	• F	• Mundboden	• schlecht	• WT	• Operation,	• posterio-oral	• 2	• Trigon Röntgen Zunge und
• 15	• 63	• M	• Mandeln	• moderat	• WT	• Operation,	• Mundboden	• 2	• SCC Alveolarkam m Chemotherapy

• 16	• 76	• F	• Larynx	• schlecht	• MAA	• Röntgen	• supraklavikulär	• 1
				• diff.			e	
• 17	• 56	• M	• Larynx	• SCC			• Masse	
				• moderat	• WT	• Operation,	• Zungenbasis,	• 2
				• diff. SCC		• Röntgen,	• Tonsillengrube	
• 18	• 56	• M	• L. lateral	• moderat	• WT	• Chemo		
			• Pharyngeal-	• diff. SCC		• Chemo	• Gesichts-Hals-	• 2
			Wand				• Masse	

Tabelle 6 (Fortsetzung):

• Patien t.Nr.	• Alte r	• Geschlech t	• primärer Krebs	• Pathologi e	• p53- Genoty p	• bisherige fehlgeschlagen e	• Stelle des Gentransfer Therapien s	• *Studien - • zweig s
-------------------	-------------	------------------	---------------------	------------------	-----------------------	------------------------------------	--	---------------------------------

• 19	• 53	• M	• unbekannt	• schlecht	• WT	• Operation	• submentale	• 1
				• diff.	• Röntgen,	• Röntgen,	• Masse	
• 20	• 55	• M	• Zunge	• SCC	• Chemo	• Chemo		
				• diff.	• Operation,	• Operation,		
• 21	• 66	• M	• Zungenbasi	• gut diff.	• Halsmasse	• Halsmasse	• Halsmasse	• 2
			S	• SCC	• Röntgen	• Röntgen		

TABELLE 7

Vektordosierung und Gegenwart oder Abwesenheit von adenoviralen Vektornucleotiden im Serum oder Urin während der Behandlung

• Patient	• PFU/ Transfer	• injiziertes Volumen	• Gen- transfer- cyclen	• Injektionsstellen
• 1	• $10^6$	• 6cc	• 2	• Gesichtsmasse
• 2	• $10^6$	• 3cc	• 2	• Submentalmasse, Neopharynx
• 3	• $10^6$	• 3cc, 4cc	• 1	• linke Halsmasse
• 4	• $10^6$	• 3cc, 5cc	• 1 + 3	• rechte Halsmasse
• 5	• $10^6$	• 1,5cc	• 1	• linke Halsmasse
• 6	• $10^6$	• 3cc	• 1	• Peristomalmasse
• 7	• $10^7$	• 2cc	• 4 + 2	• linke Halsmasse
• 8	• $10^7$	• 3cc	• 1	• Zungenbasismasse
• 9	• $10^7$	• 1,5cc	• 1	• Peristomalrekurrenz
• 10	• $10^8$	• 1,5cc	• 1	• hypopharyngiale Masse
• 11	• $10^8$	• 3cc	• 1	• Zungenbasis
• 12	• $10^8$	• 1,5cc	• 3	• linker retromolarer Trigon
• 13	• $10^9$	• 1,5cc	• 6	• rechte hintere Zunge und Zungenbasis
• 14	• $10^9$	• 1,5cc	• 1 + 1	• Mundboden
• 15	• $10^9$	• 3cc	• 1	• linke Gesichtsmasse
• 16	• $10^9$	• 1,5cc	• 1	• linke supraklavikuläre Masse
• 17	• $10^9$	• 1,5cc	• 1	• Zungenbasis, Tonsillengrube
• 18	• $10^9$	• 3cc	• 4	• linke Gesichtsmasse
• 19	• $10^{9,5}$	• 1,5cc	• 1	• Submentalmasse
• 20	• $10^{9,5}$	• 3cc	• 3	• linke Halsmasse
• 21	• $10^{9,5}$	• 1,5cc	• 3	• rechte Halsmasse

**[0196]** Dosierung. Der adenovirale Vektor wurde an jeweils 5 Kohorten von Patienten und in logarithmisch ansteigenden Dosen verabreicht. Dosiserhöhungen wurden nach einer zweiwöchigen Beobachtung des letzten Patienten, der mit der vorherigen Dosis behandelt wurde, festgelegt. Nach dem Eintritt der ersten 6 Patienten in die Studie wurden 3 Patienten mit einer jeweiligen Dosierungskonzentration unabhängig von der resektierbaren oder unresektierbaren Gruppe, in die die Patienten eingeteilt waren, aufgenommen. Die Dosis des biologischen Vektors wird hinsichtlich der Gesamtdosis (in plaquebildenden Einheiten) beschrieben. Die ge-

schätzte Anzahl von pro maligner Epithelzelle verabreichten Vektoren wurde nicht approximiert. Das Verabreichungsgesamtvolumen ist in Tabelle 7 gezeigt. Das in die soliden Malignitäten injizierte adenovirale Vektorvolumen wurde durch das klinische und radiographisch geschätzte Tumorvolumen bestimmt. Der Vektor wurde direkt unter direkter Betrachtung und durch manuelles Ertasten in die rekurrenten Plattenepithelkarzinome injiziert. Die Injektionen waren in 1-cm-Inkrementen über die Massen beabstandet. Nach dem Gentransfer verblieben die Objekte für mindestens 1–1/2 Stunden unter sorgfältiger Beobachtung. Die Atmungs- und Körpersekretionsisolierung wurden 72 h nach dem letzten Gentransfer des Vektors beibehalten.

**[0197]** Vektornachweis. Die Urin- und Serumproben wurden auf verteilte adenovirale Vektoren untersucht unter Verwendung einer Viruskultur von 293-Zellen sowie von Polymerasekettenreaktionen (PCR) unter Verwendung von Primern, die die E1b-Region des Adenovirus und das 5'-Ende des Wildtyps p53-Gens amplifizieren, die für den Vektor spezifisch waren, amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden anschließend durch Southern Blot transferiert, um den Virusnachweis von 1–5 Viruspartikeln zu verbessern sowie die PCR-Produktspezifität zu verifizieren. Bei jeder Reaktion wurden positive und negative Kontrollen bewertet.

**[0198]** Sicherheit. Die Symptome, Vitalzeichen, Blutzählungen wurden aufgezeichnet, und die Patienten wurden physisch untersucht und photographisch täglich dokumentiert. Eine Brustradiographie, ein Blutchemiestest und eine Leistungsstatusanalyse wurden zu Beginn von jedem Behandlungscyclus durchgeführt. Die Serumtitre von adenoviralem Antikörper wurden vor und nach jedem Gentransferycyclus gemessen. Drei Tage nach dem sechsten Gentransfer des ersten Cyclus wurden Tumorbiopsien (oder operative Resektion) erhalten. Die Proben wurden als schockgefrorene pathologisch eingebettete Proben sowie als Formalin-fixierte Proben in jedem Fall aufbewahrt.

**[0199]** Extraktion von Nucleinsäuren aus Serum oder Urin. Ad5CMV-p53-Adenovirus-DNA wurde aus 0,5-ml-Aliquoten von Serum oder Urin durch ein modifiziertes Verfahren nach Cunningham et al. (1995) extrahiert. Kurz gesagt, wurde destilliertes Wasser zugesetzt, um 1 ml zu erreichen, und sie wurden mit 30% Polyethylenglycol (PEG) präzipitiert. Da SDS allein nicht ausreichte, um die Virus-DNA aus ihren Partikeln freizusetzen, wurde dem SDS Proteinase K bei 50°C 2–16 h nach der PEG-Präzipitation zugesetzt (Norder et al., 1990). Die Proben wurden mit Phenol extrahiert, und die Virus-DNA wurde mit Ethanol in Gegenwart von Glycogen (Cunningham et al., 1995) präzipitiert. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugieren bei 14000 g für 10 min bei 4°C gewonnen, in 0,3 ml destilliertem Wasser resuspendiert und wieder mit Ethanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gespült, Vakuum-getrocknet und in 10 µl destilliertem Wasser gelöst. Die Proben wurden entweder sofort analysiert oder bei –20°C bis zum Gebrauch aufbewahrt. Die Extraktion der Nucleinsäuren wurde unter biologischen Sicherheitsabzügen durchgeführt, um mögliche Kreuzverunreinigung der Proben zu verhindern.

**[0200]** PCR-Reaktionen mit DNA, isoliert aus Serumproben. Primer zur spezifischen Amplifikation des p53-Gens aus dem adenoviralen Vektor wurden konstruiert. Der obere Primer (5'-CACTGCCAACACAC-CA-3', SEQ ID NO: 5) entspricht dem 3'-Ende des p53-Gens, und der untere Primer (5'-GCCACGCCACACATT-3' SEQ ID NO: 6) entspricht der E1B-Region des Adenovirus Typ 5 (Nucleotide 3517 bis 3533 der Wildtypsequenz). Jedes PCR-Reaktionsröhren enthielt 0,2 mM von jedem Oligonukleotid, 0,4 mM dNTPs, 1X TaqPlus Long salzarmen Puffer (von Stratagene), 0,6 µl TaqPlus Long (5 U/ml) (von Stratagene) und 5 µl Test-DNA. Die Proben wurden in einen MJ Research Peltier Thermal Cycler (PTC-200) gebracht, der auf 3 min bei 93°C mit dem folgenden Dreistufenprofil programmiert war: 30 s bei 93°C, 45 s bei 65°C und 45 s bei 72°C für insgesamt 30 oder 35 Cyclen. 5 µl 6X Ladungspuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylolcyanol FF und 15% Ficoll (Typ 400, Pharmacia) in Wasser) wurde jedem Röhrchen am Ende des PCR-Durchgangs zugesetzt und auf ein 1% Agarosegel 1X TBE-Gel geladen, das Ethidiumbromid (0,6 µg/ml) enthielt. Die Proben wurden bei 100 V 1–1,5 h elektrophoresiert und sodann unter UV-Licht photographiert.

**[0201]** Polymerasekettenreaktion (PCR). Nur 5 µl der hergestellten DNA konnten in einer einzigen Polymerasekettenreaktion verwendet werden. Für das Serum wurde die PCR in einem 20-µl-Volumen durchgeführt, enthaltend 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 200 µM von jedem der Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP), 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 5 µM von jedem der Primer und 1,7 Einheiten Taq-DNA-Polymerase (Promega). Die Reaktionen wurden 30 s bei 94°C, 30 s bei 58°C und 60 s bei 72°C für 35Cyclen, gefolgt von einer 10-min-Verlängerung bei 72°C, durchgeführt. Die PCR-Primer wurden aus der Sequenz des Ad5CMV-p53 mit dem sense-Primer selektiert, der am 3'-Ende der p53-cDNA (5'-GCCTGTCCTGGGAGAGACCG-3', SEQ ID NO: 7) angeordnet war, und der Antisense-Primer wurde aus der E1B-Region des Adenovirus Typ 5 (5'-CCCTTAAGGCCACGCCACAC-3', SEQ ID NO: 8) selektiert. Das PCR-Produkt (ein 838-bp-Fragment) wurde auf 1% Agarosegel aufgetrennt. Dasselbe PCR-Produkt wurde in den pCR-Skript-Vektor (Stratagene) subkloniert, sequenziert, und das Gel-gereinigte Insert wurde als Sonde zum Nachweis des PCR-Produkts ver-

wendet. Für Urin wurde die PCR in einem 20- $\mu$ l-Volumen, enthaltend 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin, 200  $\mu$ M von jedem der Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP), 5  $\mu$ M von jedem der Primer und 2,5 Einheiten TaqPlus long DNA Polymerase (Stratagene), durchgeführt. Die Reaktionen wurden 60 s bei 93°C und sodann 30 s bei 93°C, 45 s bei 65°C und 45 s bei 72°C für 35Cyclen, gefolgt von einer 10-min-Verlängerung bei 72°C, durchgeführt. Die PCR-Primer wurden aus der Sequenz des Ad5CMV-p53 mit dem Senseprimer selektiert, der am 3'-Ende der p53-cDNA (5'-CACTGCCAACACACCA-3', SEQ ID NO: 9) angeordnet war, und der Antisenseprimer wurde aus der E1B-Region des Adenovirus Typ 5 (5'-GCCACGCCACACATT-3', SEQ ID NO: 10) selektiert. Das PCR-Produkt (ein 724-bp-Fragment) wurde auf 1% Agarosegel aufgetrennt.

**[0202]** Southern Blot Analyse. Bei dem zur Verifizierung der PCR-Produktspezifität verwendeten Southern Blot wurde die DNA in dem Gel denaturiert und vor dem Blotten auf Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham) durch Kapillarabsorption denaturiert. Die Membran wurde 15 min bei 65°C in Rapid-hyb-Puffer (Amersham) vorhybridisiert und im gleichen Puffer, der eine <sup>32</sup>P-markierte Sonde enthielt, 1–2 h hybridisiert. Die Membran wurde in 0,1  $\times$  SSC und 0,1% SDS zweimal bei Raumtemperatur und wiederum zweimal bei 65°C (15 min pro Wäsche) gewaschen. Die gewaschene Membran wurde einem Röntgenfilm 1–16 h bei –70°C unter einem Intensivierungsschirm ausgesetzt.

**[0203]** Kontrollen und Bewertung der Testproben. Die folgenden Kontrollen waren bei jeder Charge von Proben eingeschlossen. Im DNA-Isolierungsschritt wurden zwei "negative" Serumkontrollen (von der Belegschaft der Firma Introgen vereinigtes und aliquotiertes Serum) und zwei positive Kontrollen, bestehend aus Negativserum, gespickt mit 10 PFU oder 100 PFU AdCMV-p53-Virus eingesetzt. Dies erfolgte, um ein Empfindlichkeitsfenster zu erhalten, wobei die 10 (und 100)-PFU-Kontrollen positiv waren, jedoch die negativen Kontrollen negativ waren. Wenn die negativen Kontrollen positiv waren, wurde die PCR mit nur 30 Cyclen wiederholt. Wenn die 10-PFU-Kontrollen negativ waren, wurde die DNA weiter mit einer zusätzlichen Ethanolpräzipitation gereinigt, und die PCR wurde wiederholt. Die beiden obigen zwei Schritte ordneten immer die experimentellen Parameter in dem entsprechenden Empfindlichkeitsfenster an.

**[0204]** Im PCR-Stadium wurde eine positive Kontrolle von 1 ng AdCMV-p53-DNA (isoliert aus einer klinischen Charge) und eine negative (H<sub>2</sub>O) Kontrolle eingesetzt. Die PCR der Charge wurde wiederholt, wenn eine der Kontrollen falsch war. Es gab keine falsch negativen PCR-Kontrollen.

**[0205]** Zur Bestätigung der putativen positiven Kontrollen wurde die DNA aus Serum (zusammen mit mehreren vorübergehend danebenliegenden Proben) reisoliert und die PCR dieser DNA wiederholt. Die Proben wurden nur als positiv eingestuft, wenn die Ergebnisse reproduziert werden konnten. Diejenigen Proben, die in einer von zwei Probenanalysen positiv waren, wurden zu Berichtszwecken als negativ betrachtet. Die putativen Positivkontrollen, die nicht wiederholt werden konnten (aufgrund einer mangelnden weiteren unverarbeiteten Probe) wurden aus der Datenbasis weggelassen.

**[0206]** Messwirksamkeit des Gentransfers. Operativ entfernte Gewebeproben wurden in Tiefkühlröhrchen gebracht, sofort schlagartig tiefgefroren und sodann in flüssigem Stickstoff bis zum Gebrauch gelagert. Die eingefrorenen Proben wurden in die Öffnung eines Bessman-Edelstahl-Gewebepulverisierers (Spectrum, Houston, TX) dekantiert, der durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff vorgekühlt wurde. Das Gewebe wurde durch 5- bis 10maliges Schlagen des Bessman-Pistills mit einem Stahlhammer zu einem feinen Pulver zermahlen. Das pulverisierte Gewebe wurde in einen Gewebehomogenisator aus Glas (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), der 1 ml TRI-Reagens (Molecular Research, Cincinnati, OH) pro 50 mg Gewebe enthielt, übergeführt und durch 5- bis 10maliges Auf- und Abschlagen mit einem Teflon-Pistill homogenisiert.

**[0207]** Nach der Homogenisierung wurde die RNA nach den Vorgaben, die mit dem TRI-Reagens mitgeliefert wurden, isoliert. Kurz gesagt, wurden die Homogenate in Polypropylenzentrifugentröpfchen (Molecular Research) übergeführt und vor der Zugabe von Chloroform (0,2 ml pro 1 ml TRI-Reagens) 5 min bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden die Proben kräftig gemischt, für zusätzliche 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 12000  $\times$  g bei 4°C 15 min zentrifugiert, um die RNA-enthaltende wässrige Schicht von der Phenol-Chloroform-Phase abzutrennen. Der wässrigen Phase wurde Isopropanol zugesetzt und RNA wurde durch Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min ausgefällt. Die RNA-Pellets wurden durch Zentrifugation bei 12000  $\times$  g 15 min bei 4°C gewonnen, einmal mit 75% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, in Diethylpyrocarbonat-(DEPC)-behandeltem Wasser gelöst und durch Messen der Extinktion bei 260 nm quantifiziert. Begleitende DNA wurde durch Inkubation von bis zu 50  $\mu$ g RNA mit 60 U DNase I (Pharmacia, Piscataway, NJ) 25 min bei 37°C in einem Gesamtreaktionsvolumen von 260  $\mu$ l entfernt. Anschließend wurde die RNA mit Phenol:Chloroform extrahiert, Ethanol-präzipitiert, einmal mit 75% Ethanol gewaschen, durch Zentrifugation mit

maximaler Geschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge für 15 min bei 4°C pelletisiert, luftgetrocknet, in DEPC-Wasser resuspendiert und bei –80°C gelagert. Die Qualität der RNA wurde durch Laufenlassen der Proben auf einem üblichen nicht-denaturierenden 0,8% Agarosegel und Sichtbarmachen der 28S- und 18S-Ribosomenbanden durch Ethidiumbromidfärbung bewertet. Zur Beseitigung von Kreuzverunreinigungen zwischen Proben und zur Minimierung der RNase-Aktivität wurden alle wiederverwendbaren Instrumente, die zur RNA-Isolierung eingesetzt wurden, mindestens 5 min in einer 2%igen Liqui-Nox (Fisher Scientific)-Detergenslösung eingeweicht, von Abfällen freigeschrubbtt, für 3 min in eine 10%ige Bleichlösung übergeführt, sorgfältig mit deionisiertem Wasser gespült, mit 100% Ethanol besprührt, getrocknet, in Chloroform eingetaucht und wiederum vor der Verwendung getrocknet.

**[0208]** Die reverse Transkription wurde unter Verwendung von 1,5 µg Gesamtzell-RNA in einem 23,5 µl Reaktionsgemisch, enthaltend 111 ng Random-Hexamere (Gibco BRL, Grand Island, NY), 40 Einheiten RNase-Inhibitor (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), jeweils 0,4 mM dNTP (Perkin Elmer, Foster City, CA) und 300 Einheiten Superscript II RNase H<sup>–</sup>-reverse Transkriptase (Gibco BRL), in 1 × RT-Puffer (50 mM Tris pH 8,3, 75 mM Kaliumchlorid, 3 mM Magnesiumchlorid und 20 mM Dithiothreitol), durchgeführt. Die RNA und die Random-Hexamere wurden für 10 min auf 70°C erhitzt und bevor der Rest des Reaktionsgemisches zugesetzt wurde, auf Eis abgekühlt. Die Reaktion wurde vor der Inkubation bei 42°C für 50 min 5 min bei 25°C mit 200 Einheiten reverser Transkriptase inkubiert und sodann zusätzliche 10 min bei 25°C, gefolgt von der Zugabe von weiteren 100 Einheiten reverser Transkriptase, um die Primerannahme zu erleichtern. Die RT-Reaktionen wurden durch Wärmeinaktivierung der reversen Transkriptase für 15 min bei 70°C gestoppt. Die zu der cDNA komplementäre RNA wurde durch Verdau mit 1 Einheit RNase H (Boehringer Mannheim) für 20 min bei 37°C entfernt. Die mit dem rekombinanten Adenovirus AdCMV-p53 infizierte (Infektionsmultiplizität von 100:1) RNA aus der Kopf- und Hals-Plattenepithelkarzinom-(HNSCC)-Linie TU167, wurde als positive Kontrolle zum Nachweis von viral transkribiertem p53 verwendet, und TU167-Zellen, infiziert mit dem varianten Adenovirusvektor dl312 (1), der die p53-Transkriptionseinheit nicht enthält, wurden als negative Kontrolle verwendet.

**[0209]** Zum Nachweis des Ad5CMV-p53-Transkripts wurde die PCR in einem Reaktionsvolumen von 30 µl, enthaltend 0,2 mM jeweils von dNTP, 1,5 mM Magnesiumchlorid, 1 Einheit taq-Polymerase (Promega, Madison, WI) und 0,5 mM von jedem Primer CMV2 (5'-GGTGCATTGGAACGCGGATT, SEQ ID NO: 11) und P53EX3 (5'-GGGGACAGAACGTTTTTC, SEQ ID NO: 12) in 1 × PCR-Puffer (50 mM Kaliumchlorid, 10 mM Tris pH 9,0, 0,1% Triton X-100), durchgeführt. Die CMV2- und P53EX3-Primer amplifizieren ein 295 Basenfragment, das auf das von Adenovirus abgeleitete p53-Transkript spezifisch ist. Die PCR-Bedingungen zum Nachweis von Ad5CMV-p53-Transkripten waren wie folgt:

1 min bei 94°C, anschließend 30 s bei 94°C, 40 s bei 58°C, 1 min bei 70°C für 35Cyclen und 10 min Verlängerung bei 70°C.

**[0210]** Um zu gewährleisten, dass das während der PCR amplifizierte Produkt mRNA und keine verunreinigende DNA in der RNA-Präparation detektiert, wurde auch eine PCR unter Verwendung von RT-Produkten sämtlicher Parallelreaktionen, wobei keine reverse Transkriptase zugesetzt wurde, durchgeführt.

**[0211]** Die RT-PCR, die auf Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) spezifisch ist, wurde durchgeführt, um die Integrität der RT-Reaktionen zu überprüfen. Ein 3-µl-Volumen der RT-Reaktion wurde in 30 µl PCR-Gemisch, enthaltend 0,2 mM von jedem dNTP, 2 mM Magnesiumchlorid, 1 Einheit taq-Polymerase und 0,5 mM von jedem Primer GAPDH1 (5' ACGGATTGGTCGTATTGGG, SEQ ID NO: 13) und GAPDH2 (5' TGATTTGGAGGGATCTGC, SEQ ID NO: 14), in 1 × PCR-Puffer verdünnt. Die GAPDH-Primer umspannen 3 Exons in dem menschlichen GAPDH-Gen und amplifizieren ein 231 Basenprodukt, das auf mRNA spezifisch ist. Die PCR-Bedingungen zum Nachweis von GAPDH waren wie folgt:

1 min bei 94°C, anschließend 30 s bei 94°C, 12 s bei 60°C, 1 min bei 72°C für 35Cyclen und 7 min Verlängerung bei 72°C.

**[0212]** Die PCR wurde unter Verwendung eines Perkin Elmer Gene Amp 9600 Thermocyclers durchgeführt, und sämtliche Primer wurden kommerziell synthetisiert (Genosys, Woodlands, TX).

**[0213]** Immunhistochemische Bestimmung eines intratumoralen Gens. Immunperoxidasesstudien wurden auf Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten unter Anwendung des Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex-(ABC)-Verfahrens (1) durchgeführt. Die Proben wurden 3–4 µm dick geschnitten, in Xylol deparaffiniert und in Ethanol mit absteigenden Graden (100–70%) rehydratisiert. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde mit 3% Wasserstoffperoxid in Methanol blockiert. Nach mehreren Waschvorgängen in destilliertem Wasser und Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) wurden die Schnitte mit einer 1:10 Verdünnung von normalem Pferdeserum zur Minimierung der Hintergrundfärbung inkubiert. Hierauf folgte die Inkubation bei 4°C über

Nacht mit monoklonalen Antikörpern auf p53 (DO-1, Oncogene Science, Inc., Uniondale, NY; 1:80 Verdünnung) und p21 (Oncogene Science, Inc., 1:100). Das Peroxidasefärbeverfahren erfolgte unter Verwendung von ABC-Elite-Testsätzen (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Die Immunfärbereaktion wurde unter Verwendung von 0,05% 3,3'-Diaminobenzidin in Tris-HCl-Puffer, enthaltend 0,01% Wasserstoffperoxid, pH 7,6, sichtbar gemacht. Die Schnitte wurden mit 0,01% Toluidinblau gegenfärbt und in Permount fixiert. Die Bewertung wurde durch Zählen der positiven nukleären Färbung in 200 Zellen von 10 aufeinander folgenden Hochenergiefeldern durch zwei unabhängige Beobachtungen durchgeführt.

**[0214]** TUNEL-Test auf DNA-Fragmentierung. Der TUNEL-Test wurde unter Verwendung des Apoptag™ PLUS-Testsatzes (Oncor, Gaithersburg, M. D.) nach den vom Hersteller bereitgestellten Anweisungen durchgeführt. Die Deckgläschchen wurden mit 0,4% Methylengrün gegenfärbt. Die entsprechenden Hämatoxilin- und Eosin-gefärbten Deckgläschchen wurden auf die Gegenwart von entzündlichen Zellinfiltraten bewertet und auf einer Skala von 1–4 benotet.

**[0215]** Testverfahren auf die zytopathische Wirkung. Patienten-Urinproben wurden auch auf die Gegenwart von Ad5p53 durch einen Test überwacht, wobei mit jedem Virus in der Probe eine Empfänger-Zellmonoschicht infiziert wird. Die folgenden Zellen werden auf das Auftreten einer zytopathischen Wirkung (CPE) überwacht: die Zellen runden sich ab und lösen sich von der Oberfläche ab. Die Patienten-Urinproben, die auf die CPE getestet wurden, stammten aus dem ersten Morgenurin, der während der zweiten Woche des ersten Behandlungscyclus und am Tag 0 oder 1 (vor der Behandlung) gesammelt wurde. Die Proben von jeweils ungefähr 15 ml wurden in sterilen 15 ml konischen Röhrchen bei –80°C bis zur Verwendung gelagert. Die IT293-Zellen, die die Empfängerzellmonoschicht bei diesem Test bilden, werden in DMEM plus 10% FBS in einem 37°C befeuchteten 10% CO<sub>2</sub>-Inkubator gehalten. Zwei Tage vor dem Testen der Patientenprobe wurden die Zellen mit 2 × 10<sup>5</sup> pro Vertiefung in 12-Well-Platten übergeführt.

**[0216]** Zum Testzeitpunkt wurden die Urinproben in einem Eisbad aufgetaut, und ein Aliquot wurde 1:1 mit DMEM vermischt und unter Verwendung eines 0,22 µm Spritzenfilters steril filtriert. Ein 350-µl-Aliquot dieses 1:1-Gemisches wurde jeder Vertiefung nach Entfernung des Wachstumsmediums langsam zugesetzt. 15 min später wurde die Platte leicht hin- und hergeschüttelt. Nach 30 min wurden jeder Vertiefung 2,0 ml DMEM plus 10% FBS zugefügt, um die Proben zu verdünnen. Am Tag 3 (72 h später) und am Tag 6 des Tests wurden jeder Vertiefung 0,5 ml Aliquote frisches Medium zugesetzt, um die Zellmonoschicht für das Maximum von 6–7 Tagen aufrechterhalten zu helfen.

**[0217]** Die Patientenproben wurden dreifach getestet. Die verdünnte Vorbehandlungsprobe wurde wie sie ist und auch gespickt mit 10<sup>5</sup> PFU Ad5p53 pro Vertiefung getestet, um jede Urinkomponente nachzuweisen, die den Nachweis von Virus durch dieses Verfahren beeinträchtigen könnte. Die Kontroll-Vertiefungen wurden jeweils zweifach mit DMEM allein, gespickt mit 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> oder 10<sup>1</sup> PFU pro Vertiefung angeimpft. Die mit 10<sup>5</sup> PFU gespickte Probe verursacht unter diesen Bedingungen am Tag 2 des Tests eine CPE. An jedem darauf folgenden Tag zeigte die nächste gespickte Kontrolle eine CPE. Darum gibt die Zeit, bei der eine CPE in jeder Patientenprobe nachgewiesen wird, die Konzentration von Ad5p53 in dieser Probe an.

**[0218]** Rekombinantes kompetentes Adenovirus. Adenovirales p53, das in den klinischen Tests verwendet wurde, wurde auf die Gegenwart von RCA unter Verwendung von A549-Zellen von Biotechnology Services Division of Microbiological Associates, Inc. (Rockville, Maryland) getestet.

**[0219]** Statistische Analyse. Eine Single-arm-Studie wurde angewandt. Zur Vermeidung, dass sich mehr Patienten als notwendig in eine Untersuchung mit exzessiver Toxizität einschrieben, wurde eine Bayesianische frühe Stopptregel implementiert. Der WILCOXON-Rangsummentest und Zuordnungstest wurden zu Vergleichen des Prozentsatzes an Zellen, die TUNEL- bzw. immunhistochemische Färbung zeigten, vor und nach der Behandlung verwendet. Die statistische Analyse wurde unter Verwendung des Survpac SPSS-Statistikpakets durchgeführt.

**[0220]** Antwort und Toxizität. Das Überleben und die Antwort wurden in dieser Interimsanalyse bewertet, wurden allerdings nicht als Ziel dieser Analyse angesehen. Das Ziel dieser Zwischenanalyse bestand in der Bestimmung des Transduktionspotentials dieser Gentransferstrategie. Die Patienten wurden auf die Antwort und Toxizität nach einer 30-tägigen Beobachtung nach einem Gentransferzyklus bewertet. Die Toxizitätseffekte der Therapie wurden nach den allgemeinen Toxizitätskriterien des National Cancer Institute bewertet. (Xref.). Die Antwort auf die Therapie wurde durch CT-Scan oder Ultraschall des Halses vor jedem Behandlungsdurchgang bewertet. Die Patienten wurden auf die Antwort ausgewertet, falls mit ihnen mindestens ein Therapiedurchgang, gefolgt von einer entsprechenden Dokumentierung der Antwort, durchgeführt wurde. Diese Patienten,

mit denen eine operative Resektion ihrer rekurrenten Tumore durchgeführt wurde, konnten nicht auf die Antwort bewertet werden, da die Operation vor einem 30tägigen Beobachtungszeitraum durchgeführt wurde. Sämtliche CT-Scans wurden von einem Radiologen bewertet und die Ultrabeschallungen von einem anderen. Die Teilantwort wurde als eine 50%ige oder größere Reduktion in der Summe der Produkte des Durchmessers des messbaren Tumors definiert; eine geringfügige Antwort wurde als eine 25%ige bis weniger als 50%ige Reduktion in der Summe der Produkte der Durchmesser der messbaren Läsion bewertet. Die Krankheitsprogression wurde als eine 25%ige oder größere Zunahme in der Summe der Produkte des Durchmessers definiert.

**[0221]** Die Überlebensdauer wurde vom Zeitpunkt des Protokollbeginns bis zum Ableben gemessen. Jede Patientenantwort wurde von einem Datenmanagementkomitee, bestehend aus einem Kopf- und Hals-Onkologe, einem Radiologen und einem medizinischen Onkologen, überprüft.

#### Ergebnisse

**[0222]** Vektornachweis. Adenovirale Vektor-DNA wurde durch PCR in Serum- sowie in Urinproben von Patienten bis zu 48 h nach dem Gentransfer nachgewiesen. Die Nachweisgrenze für den Vektor beträgt 1–5 Viruspartikel. Die Virus-DNA wurde im Urin bei Patienten, mit denen ein Gentransfer von jeder Virusdosis durchgeführt wurde, isoliert, allerdings nach 48 h nach dem Gentransfer nicht nachgewiesen. Der Serumnachweis von viraler DNA erhöhte sich mit zunehmender Virusdosis über  $10^7$  PFU, war allerdings 48 h nach dem Gentransfer nicht nachweisbar.

**[0223]** Die Urinproben wurden zuerst auf das infektiöse Virus analysiert, die CPE auf Zellmonoschichten vor der PCR-Nucleotidanalyse gemessen. Das im Urin vorhandene Virus wurde auf 293-Zellen, wie vorstehend beschrieben, angewandt, um die CPE aufzuzeichnen, die beobachtet wird, wenn die Zellen sich abrunden und sich von der Petri-Schale abzeichnen. Die CPE wurde selten in den Proben festgestellt. Die CPE wurde in overlay-Kulturen spät (mehr als 6 Tage) festgestellt, und diese Ergebnisse wurden als zweideutig betrachtet. In keinem Fall wurde die CPE für nachgewiesene adenovirale Nucleotide durch PCR und Southern Blot Transfer derselben Urinprobe bestätigt.

**[0224]** Virale DNA-Analyse von anderen Organsystemen. Die PCR-Analyse zeigte Virus-DNA nach mehr als 2 Monaten nach dem  $10^9$  Ad5CMVp53-Gentransfer in der Haut, im Herzmuskel, in der Lunge, im Hodengewebe und in schockgefrorenen Autopsieproben, die vorsichtig genommen wurden, um eine Kreuzverunreinigung zwischen den Geweben zu verhindern. Nierenparenchym, Nebennierendrüsen und Pankreasgewebe zeigten keine Vius-DNA-Sequenzen, die auf diesen Vektor spezifisch waren.

**[0225]** Die immunhistochemische Analyse dieser Autopsieproben ergab keinen Beweis einer Überexpression von Wildtyp-p53-Proteinprodukt.

**[0226]** Bewertung des Gentransfers. Sämtliche Analysen wurden nach mindestens 1 h Exposition der Gewebe gegenüber dem Vektor durchgeführt. Das mRNA-Produkt wurde nach 4 und 48 h über RT-PCR nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigten nach 1 h Exposition oder weniger eingefrorene Biopsieproben keine p53-mRNA. Zusätzlich waren auch Negativkontrollproben, die aus einer operativen Stelle erhalten wurden, mit der kein Gentransfer durchgeführt wurde, ebenfalls auf das PCR-Produkt negativ. Nicht-transduzierte und transduzierte Biopsieproben von vier Patienten wurden durch RT-PCR auf die Gegenwart von Ad5CMVp53-transkribierte mRNA analysiert. Die transduzierten Proben von zwei Patienten waren auf Et-Br-gefärbten Gelen positiv, während in jeder der nicht-transduzierten Proben kein Ad5CMVp53-Produkt nachgewiesen wurde, trotz der Tatsache, dass GAPDH aus sämtlichen Proben amplifiziert werden konnte. Die Spezifität des 295-pb-PCR-Produkts aus den zwei positiven Patienten wurde durch Southern Blot bestätigt. Da das PCR-Produkt nicht festgestellt wurde, wenn die reverse Transkriptase aus der RT-Reaktion weggelassen wurde, musste das 295-pb-Produkt, das in der Figur nachgewiesen wurde, aus mRNA statt aus verunreinigter DNA generiert worden sein.

**[0227]** Immunhistochemische Analyse. Alle Prä- und Post-Gentransfer-Patientenproben wurden gleichzeitig mit positiven und negativen Kontrollen in jedem Experiment analysiert. Mehrfachschnitte einer jeden Probe wurden analysiert und mit Hämatoxilin- und Eosin-gefärbten sowie mit TDT-endmarkierten Proben verglichen. Die Post-Vektorinjektions-Biopsieproben bestätigten den Gentransfer bei drei Patienten, deren Prätransfer-Biopsieproben kein endogen überexprimiertes p53-Protein zeigten. Bei 5 von 21 Patienten (27%) war p21 (CIP/WAF1) endogen nicht signifikant exprimiert; dies erwies sich für den Gentransfer in den Patienten-Post-Gentransfer-Biopsieproben als informativ. Die p53-Kernproteinüberexpression wurde auch in Tumor-assoziierten Lymphocyten sowie im Stroma-Tumorzellen festgestellt, was somit auch eine nicht-tumorale

Zelltransduktion anzeigt.

**[0228]** Serologische Antikörperantwort. Adenovirus-Serotyp-5-Antikörper wurden bei sämtlichen Patienten nach wiederholten Injektionen des Vektors induziert. Allerdings wurde die Transduktionseffizienz nicht als signifikant verändert festgestellt, wenn der Anfangscyclus des Gentransfers und die späteren Cyclen verglichen werden. Ein mildes Tumorinjektionsstellenergythem wurde beginnend bei  $3 \times 10^9$  PFU erkannt, allerdings schränkten diese lokalen Reaktionen die Vektortoleranz nicht ein. Bei sämtlichen Patienten wurde kein Anzeichen einer systemischen Überempfindlichkeit trotz wiederholter Virusdosierung für so viel wie 6 aufeinander folgende Monate bei einem  $10^9$  PFU-behandelten Patienten festgestellt.

**[0229]** Pathologische Beobachtungen. Nadelspuren wurden in dem überwiegenden Teil der Biopsieproben festgestellt und die Genproduktexpression wurde in tieferen Geweben über die Injektionsstelle hinaus gezeigt. Gleichermaßen legte die Feststellung von endmarkierten Zellen in transduzierten Bereichen die Induktion einer Apoptose in Tumorzellen, jedoch die Abwesenheit einer Apoptose in Stromazellen und entzündeten Zellen nahe. Die entzündeten Zellen wurden bei Patienten festgestellt und wurden unter den Patienten, die Dosen von  $10^9$  PFU oder höher erhielten, zu den histologisch vorherrschenden Feststellungen. Interessanterweise zeigte der Patient Nummer 7, dessen Probe endogenes Wildtyp-p53 exprimierte, eine hämorrhagische Nekrose ohne Anzeichen eines überlebensfähigen Tumors in seriell geschnittenen Operationsproben in seiner rekurrenten 2 cm dicken Halsmasse nach einem Gentransfer-Cyclus. Die pathologischen Feststellungen der Nekrose- sowie Apoptoseinduktion waren in den Proben die häufigen Feststellungen.

**[0230]** Klinische Beobachtungen. Patienten haben die direkten tumoralen Injektionen des Vektors toleriert, wobei das häufigste unangenehme Ereignis Beschwerden an der Injektionsstellen sind. Der Beweis eines lokalen Injektionsstellenergythems wurde bei  $10^9$  PFU des Vektors und höher verzeichnet, obwohl ein systemischer Beweis für Überempfindlichkeit trotz eines Beweises von systemischen Antikörpertiterbewertungen nicht gesehen werden konnte. Bei den Patienten Nummer 5, 10 und 16 blieb ein Beweis für eine Erkrankung mit einem Mittelwert von 7 Monaten danach aus. Die Patienten 7 und 13 zeigten nach 3 bzw. 5 Monaten eine stabile Krankheit in ihrem Indikator-Läsionsbereich. Der Patient Nummer 20 zeigte zum Teil eine Antwort, wie durch CAT-Scan und Ultraschall verifiziert, entwickelte allerdings spinale und pleurale Metastasen, die die Entfernung aus der Studie aufgrund eines Krankheitsfortschrittes erforderten.

**[0231]** Schlussfolgernd ist bei Patienten mit rekurrenten Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals der adenovirale vermittelte Gentransfer von Wildtyp-p53 sicher und kann wirksam Krebs und normale Zellen über direkte tumorale Injektionen oder intraoperative Instillation des Vektors transduzieren. Keiner der Patienten zeigte Toxizität, die die Vektorverabreichung oder die Dosis-Eskalierung einschränken könnte. Die Transgenproduktexpression war trotz Entwicklung einer systemischen Antikörperantwort unverändert. Die lokalen Entzündungsreaktionen, die in den resezierten Tumorproben pathologisch festgestellt wurden, können in der Tat hilfreich sein.

#### LITERATURHINWEISE

- "Cancer facts and figures," American Cancer Society, Washington, DC: ACS, (Publication no. 90-425 M. no. 5008-LE). 1990.
- Cancer Facts and Figures, Publication No 93-400, M No. 5008-93. Washington, DC: American Cancer Society, 1993.
- Anderson et al. US 5,399,346, 1995.
- Baichwal und Sugden, "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," In: Kucherlapati R, Hrsg. Gene transfer. New York: Plenum Press, Ss. 117–148, 1986.
- Baker et al., "Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53," Science, 249: 912–915, 1990.
- Barbacid, M. "ras genes," Ann. Rev Biochem., 56: 779–827, 1985.
- Bartek et al., "Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines," Oncogene, 5: 893–899, 1990.
- Benvenisty and Neshif, "Direction introduction of genes into rats and expression of the genes," Proc. Natl Acad. Sci. USA, 83: 9551–9555, 1986.
- Berenson et al., "Frequent amplification of the bcl-1 locus in head and neck squamous cell carcinomas," Oncogene, 4: 1111–1116, 1989.
- Berges et al., "Cell proliferation, DNA repair, and p53 function are not required for programmed cell death of prostatic glandular cells induced by androgen ablation," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 8910–8914, 1993.

- Berkner, "Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes," *BioTechniques*, 6: 616–629, 1988.
- Bos, J., "ras oncogenes in human cancer: A review," *Cancer Res.*, 49: 2682, 1989.
- Boshart et al., "A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus," *Cell*, 41: 521–530, 1985.
- Boussif et al., "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7297–7301, 1993.
- Boyle et al., "The Incidence of p53 Mutation Increases with Progression of Head and Neck Cancer," *Can Res.*, 53: 4477–4480, 1993.
- Brennan et al., "Molecular Assessment of Histopathological Staging in Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck," *NEJM*, 332 (7): 429–425, 1995.
- Brown et al., "Modulation of ras Expression by Anti-sense, Nonionic Deoxyoligonucleotide Analogs," *Oncogene Res.*, 4: 243–252, 1989.
- Cai et al., "Stable expression of the wide-type p53 gene in human lung cancer cells after retrovirus-mediated gene transfer," *Human Gene Therapy*, 4: 617–624, 1993.
- Calhoun et al., "Distant Metastases from Head and Neck Squamous Cell Carcinomas," *Laryngoscope*, 104: 1199–1205, 1994.
- Campbell, in *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 13, Burden und Von Knippenberg, Hrsg. Ss. 75–83, Amsterdam, Elseview, 1984
- Chen et al., "Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene," *Science*, 250: 1576–1580, 1990.
- Chen und Okayama, "High-efficiency transfection of mammalian cells by plasmid DNA," *Mol. Cell Biol.*, 7: 2745–2752, 1987.
- Chomczynski und Sacchi, "Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction," *Anal. Biochem.*, 162: 156–159, 1987.
- Chung et al., "Discordant p53 gene mutations in primary head and neck cancers and corresponding second primary cancers of the upper aerodigestive tract," 53: 1676–1683, 1993.
- Clarke et al., "Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways," *Nature*, 362: 849–852, 1993.
- Clayman et al., "Regulation of Urokinase-Type Plasminogen Activator Expression in Squamous-Cell Carcinoma of the Oral Cavity," *Int J Cancer*, 54: 73–80, 1993.
- Couch et al., "Immunization with types 4 and 7 adenovirus by selective infection of the intestinal tract," *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88: 394–403, 1963.
- Culver et al., "in vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors," *Science*, 256: 1550–1552, 1992.
- Debus et al., "Effects of Antisense Oligodeoxyribonucleotides Complementary mRNA of the Human c-Harvey-ras Oncogene on Cell Proliferation," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 116 (Suppl. Part 1): S-162, 1990.
- Der und Cooper, *Cell*, 32: 201–8, 1983.
- Diller et al., "p53 function as a cell cycle control protein in osteosarcomas," *Mol. Cell. Biol.*, 10: 5772–5781, 1990.
- Donehower et al., "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors," *Nature*, 356: 215–221, 1992.
- Dubensky et al., "Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 81: 7529–7533, 1984.
- El-Deiry et al., "WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G<sub>1</sub> arrest and apoptosis," *Cancer Res.*, 54: 1169–1174, 1994.
- Fearon et al., *Science*, 247: 49, 1990.
- Fechheimer et al., "Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 84: 8463–8467, 1987.
- Ferkol et al., *FASEB J.*, 7: 1081–1091, 1993.
- Field et al., "Elevated expression of the c-myc oncprotein correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma," *Oncogene*, 4: 1463–1468, 1989.
- Field et al., "The Role of the p53 Tumor Suppressor Gene in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck," *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 119: 1118–1122, 1993.
- Fraley et al., "Entrapment of a bacterial plasmid in phospholipid vesicles: Potential for gene transfer," *Proc Nat'l Acad. Sci. USA*, 76: 3348–3352, 1979.
- Fridman et al., "The minimal fragments of c-Raf-1 and NF1 that can suppress a v-Haras-induced phenotype;" *J. Biol. Chem.*, 269: 30105–30108, 1994.
- Friedmann, "Progress toward human gene therapy," *Science*, 244: 1275–1281, 1989.
- Fujiwara et al., "Therapeutic effect of a retroviral wild-type p53 expression vector in an orthotopic lung cancer

model," *JNCI* 86: 1458–1462, 1994.

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

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

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

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

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

Goding, 1986, in *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d Hrsg., Orlando, Fla., Academic Press, 1986, Ss. 60–61, 65–66, 71–74.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Kohler und Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6: 511–519, 1976.

Kohler und Milstein, *Nature*, 256: 495–497, 1975.

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

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

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

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

988–990, 1993.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Myers, EPO 0273085

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

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

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

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

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

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

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

Perales et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 91: 4086–4090, 1994.

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

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

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

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

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

- Renan, "Cancer genes: current status, future prospects, and applicants in radiotherapy/oncology," *Radiother. Oncol.*, 19: 197–218, 1990.
- Rich et al., "Development and analysis of recombinant adenoviruses for gene therapy of cystic fibrosis," *Hum. Gene Ther.*, 4: 461–476, 1993.
- Ridgeway, "Mammalian expression vectors," In: Rodriguez RL, Denhardt DT, ed. *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Stoneham: Butterworth, pp. 467–492, 1988.
- Rippe et al., "DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture," *Mol. Cell Biol.*, 10: 689–695, 1990.
- Rodrigues et al., "p53 mutations in colorectal cancer;" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 7555–7559, 1990.
- Rosenfeld et al., "in vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium," *Cell*, 68: 143–155, 1992.
- Rosenfeld et al., "Adenovirus-mediated transfer of a recombinant a1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo," *Science*, 252: 431–434, 1991.
- Roth et al., US 6627189, 2003
- Sacks et al., "Establishment and Characterization of Two New Squamous Cell Carcinoma Cell Lines Derived from Tumors of the Head and Neck," *Cancer Res.*, 48: 2858–2866, 1988.
- Shaulsky et al., "Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis," *Mol Cell Biol*, 10 (12): 6565–6567, 1990.
- Shaw et al., "Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4495–4499, 1992.
- Shirasawa et al., "Altered Growth of Human Colon Cancer Cell Lines Disrupted at Activated Ki-ras," *Science*, 260: 85–88, 1993.
- Somers et al., "Amplification of the int-2 gene in human head and neck squamous cell carcinomas," *Oncogene*, 5: 915–920, 1990.
- Southern und Berg, "Transformation of Mammalian Cells to Antibiotic Resistance with a Bacterial Gene Under Control of the SV40 Early Region Promoter," *J. Mol. App. Gen.*, 1: 327–341, 1982.
- Stratford-Perricaudet und Perricaudet, "Gene transfer into animals: the promise of adenovirus," s. 51–61, In: *Human Gene Transfer*, Hrsg. O. Cohen-Haguener und M. Boiron, Editions John Libbey Eurotext, France, 1991.
- Stratford-Perricaudet et al., "Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector," *Hum. Gene Ther.*, 1: 241–256, 1990.
- Su et al., "Production of Recombinant Porcine Tumor Necrosis Factor Alpha in a Novel E.coli Expression System," *Biotechniques*, 13 (5): 756–761, 1992.
- Tabin et al., *Nature*, 300: 143–149, 1982.
- Takahashi et al., "The p53 gene is very frequently mutated in small-cell lung cancer with a distinct nucleotide substitution pattern," *Cancer Res.*, 52: 734–736, 1992.
- Thawley und Panje, Hrsg., "Comprehensive Management of Head and Neck Tumors," Philadelphia: WB Saunders, 2: 1158–1172, 1987.
- Top et al., "Immunization with live types 7 and 4 adenovirus vaccines. II. Antibody response and protective effect against acute respiratory disease due to adenovirus type 7," *J. Infect. Dis.*, 124: 155–160, 1971.
- Tur-Kaspa et al., "Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes," *Mol. Cell Biol.*, 6: 716–718, 1986.
- van der Riet et al., "Frequent loss of chromosome 9 p21–22 early in head and neck cancer progression," *Cancer Res.*, 54: 1156–1158, 1994.
- Wagner et al., *Science*, 260: 1510–1513, 1993.
- Wang et al., "Apoptosis induced in human osteosarcoma cells is one of the mechanisms for the cytoidal effect of AdCMV-p53," *Cancer Gene Therapy*, 2 (1): 1–9, 1995.
- Watling et al., "Overexpression of p53 in Head and Neck Cancer," *Head and Neck*, 14: 437–444, 1992.
- Wijsman et al., "A new method to detect apoptosis in paraffin section: in situ end-labeling of fragmented DNA," *J. Histochem. Cytochem.*, 41: 7–12, 1993.
- Wilcock und Lane, "Localization of p53, retinoblastoma, and host replication proteins at sites of viral replication in herpes-infected cells," *Nature*, 349: 429–431, 1991.
- Wong et al., "Appearance of β-lactamase activity in animal cells upon liposome mediated gene transfer," *Gene*, 10: 87–94, 1980.
- Wu und Wu, "Receptor-mediated in vitro gene transfections by a soluble DNA carrier system," *J. Biol. Chem.*, 262: 4429–4432, 1987.
- Wu und Wu, *Adv. Drug Delivery Rex*, 12: 159–167, 1993.
- Wu und Wu, "Evidence for targeted gene delivery to HepG2 hepatoma cells in vitro," *Biochemistry*, 27: 887–892, 1988.
- Wu und Levine, "p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 3602–3606,

1944.

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

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

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

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

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

Zhang et al., WO 9633280, 1996

Zhang und Roth, US 2003083303

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

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

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE INFORMATION

- (i) Anmelder:  
(A) NAME: Board of Regents, the  
University of Texas System  
(B) STRASSE: 201 WEST 7<sup>TH</sup>  
(C) STADT: AUSTIN  
(D) STAAT:TEXAS  
(E) LAND: USA  
(F) ZIP: 78701
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: VERFAHREN UND  
ZUSAMMENSETZUNGEN ZUR  
BEHANDLUNG VON KREBS
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 14
- (iv) COMPUTERLESBARE FORM:  
(A) MEDIUMTYP: Floppy disk  
(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel  
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
(D) SOFTWARE: PatentIn Release Nr. 1.0, Version Nr.  
1.30 (EPO)
- (v) AKTUELLE  
ANMELDUNGSDATEN:  
(A) ANMELDUNGSDATUM unbekannt  
(B) EINREICHUNGSDATUM gleichzeitig hiermit  
(C) KLASIFIZIERUNG unbekannt
- (vi) FRÜHERE  
ANMELDUNGSDATEN:  
(A) ANMELDUNGSDATUM: US 60/007.810  
(B) EINREICHUNGSDATUM: 30. November 1995

## (2) Informationen zu SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZMERKMALE:  
(A) LÄNGE: 2066 Basenpaare  
(B) TYP: Nucleinsäure  
(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig  
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CAAACCTAC CAGGGCAGCT ACGGTTTCGG TCTGGGCTTC TTGCAATTCTG GGACAGCCAA 60  
 GTCTGTGACT TGCACGTACT CCCCTGCCCT CAACAAAGATG TTTCGCCAAC TGGCCAGAC 120  
 CTGCCCTGTG CAGCTGTGGG TTGATTCCAC ACCCCCCCCC GGCAACCCGGG TCCGCCCAT 180  
 GGCCATCTAC AAGCAGTCAC AGCACATGAC GGAGGTTGTG AGGGGCTGCC CCCACCATGAA 240  
 GGGCTGGCTCA GATAGGGATG GTCTGGGGCC TCCTCAGCAT CTTATCCGAG TGGAAAGGAAA 300  
 TTGCGGTGTG GAGTATTGG ATGACAGAAA CACTTTTGA CATAAGTGTGG TGGTGCCTA 360  
 TGAGCCGGCCT GAGGGTGGCT CTGACTGTAC CACCATCCAC TACAACATACA TGTGTAACAG 420  
 TTCTCTGCATG GGCGGCATGA ACCGGAGGCC CATCCTCACCC ATCATCACAC TGGAAAGACTC  
 CAGTGTAAT CTACTGGGAC GGAACACAGCTT TGAGGGTGGT GTTGTGCT GTCTGGGAG 480  
 AGACCCGGGC ACAGAGGAAG AGAATCTCCG CAAGAAAGGG GACGCCTCACCC ACGAGCTGCC 540  
 CCCAGGGAGC ACTAAGGGAG CACTGCCAA CAACACCCAGC TCCTCTCCCC AGCCAAAGAA 600  
 GAAACCACTG GATGGAGAAT ATTCACCCCT TCAAGATCCGT GGGGGTGAAGC GCTTCGAGAT 660  
 GTTCCGGAGAG CTGAATGAGG CCTTGGAACT CAAGGATGCC CAGGCTGGGA AGGAGCCAGG 720  
 780

GGGGAGGAGG	GCTCACTCCA	GCCACCTGAA	GTCCAAAAAAG	GGTCAGTCTA	CCTCCGCCA	840
TAAAANACTC	ATGTTCAAGA	CGAAAGGGCC	TGACTCAGAC	TGACATTCTC	CACTTCTTGT	900
TCCCCACTGA	CAGCCTCCCA	CCCCCATCTC	TCCTCCCT	GGGATTTGG	GTTTGGGT	960
TTTGAACCCT	TGCTTGCAAT	ACGTGTCGGT	CAGAAGCACC	CAGGACTTCC	ATTGCTTGT	1020
TCCCCGGGCT	CCACTGAACA	AGTGGCCTG	CACTGGTGT	TGTTGTGG	GAGGAGATG	1080
GGGAGTAGGA	CATACCAAGCT	TAGATTTAA	GGTTTTACT	GTGAGGGATG	TTTGGGAGAT	1140
GTAAGAAATG	TTCTTGCAGT	TAAGGGTTAG	TTTACAATCA	GCACATCT	AGGTAGGGCC	1200
CCACTTCACC	GTACTAACCA	GGGAAGCTGT	CCCTCACCTG	TGAATTCT	CTAACTTCAA	1260
GGCCCCATATC	TGTGAAATGC	TGGCATTGTC	ACCTACCTCA	CAGACTGCAT	TGTGAGGGGT	1320
AATGAAATAA	TGTACATCTG	GCCTTGAAAC	CACCTTTAT	TACATGGGT	CTAGAAACTTG	1380
ACCCCCCTTGA	GGGTGCTTGT	TCCCTCTCCCC	TGTTGGTGGG	TGGGTGGTA	TTTCTACAG	1440
TTGGGCAGCT	GGTTAGGTAG	ACGGAGTTGT	CAAGTCTCTG	CTGGCCCGGC	CAAACCCCTGT	1500
CTGACAAACCT	CTTGGTGAAC	CTTAGATCCT	AAAAGGAAAT	GTCAACCCAT	CCCACACCCCT	1560
GGAGGATTTC	ATCTCTTGTA	TAGATGATCT	GGATCCACCA	AGACTTGTGT	TAGCTCAGGG	1620

TCCAATTCT TTTTCCTTT TTTTTTTT TTTCCTTTTC TTGAGACTG GGTCTCTTTG	1680
TGGCCCAAGG CTGGAGCTGGA GTGGCGTGAT CTGGCTTACT GCAGGCCCTTG CCTCCCCGGC	1740
TCGAGCAGTC CTGCGCTCAGC CTCCGGAGTA GCTGGGACCA CAGGTTCATG CCACCATGGC	1800
CAGCCAACCTT TGGCATGTTT TGTAGAGATG GGGTCTCACCA GTGTTGCCCA GGCTGGTCTC	1860
AAACTCCCTGG GCTCAGGCCA TCCACCTGTC TCAAGCCTCCC AGAGTGCTGG GATTACAATT	1920
GTGAGCCACC ACCTCCAGCT GGAAGGGTCA ACATCCTTTA CATTCCTGAA GCACATCTGC	1980
ATTTTCACCC CACCCCTCCC CTCTCTCTCCC TTTTTATATC CCATTTTAT ATCGATCTCT	2040
TATTTACAA TAAACTTTG CTGCCA	2066

## (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZMERKMALE
  - (A) LÄNGE: 293 Aminosäuren
  - (B) TYP: Aminosäure
  - (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 2066 Basenpaare
- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGICKELT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQ ID NO: 3:

CAAAACTTAC	CAGGGCAACT	ATGGCTTCCA	CCTGGGCTTC	CTGCAAGTCTG	GGACAGCCAA	60
GTCTGTATG	TGCACGTACT	CTCCTCCCT	CAATAAGCTA	TTCTGCCAGC	TGGGAAGGAC	120
GTGCCCTGTG	CAGTTGTGG	TCAGCGCCAC	ACCTCCAGCT	GGGAGCCGTG	TCCGGGCCAT	180
GGCCATCCAC	AAGAAGTCAC	AGCACTTGAC	GGGGTGTGTG	AGACGCTGCC	CCCACCATGA	240
GGGCTGCTCC	GATGGTGATG	GCCTGGCTCC	TCCCAGCAT	CTTATCCGGG	TGGAGGAAA	300
TTTGTATCCC	GAGTATCTGG	AAGACAGGCA	GACTTTTCCG	CACAGCGTGG	TGGTACCTTA	360
TGAGCCACCC	GAGGCCGGCT	CTGAGTATAAC	CACCATCCAC	TACAAGTACA	TTTGTAAATAG	420

DE 696 36 120 T2 2006.11.30

CTCCTGCATG GGGGCATGA ACCGGCCACC TATCCTTACCAATCATCACAC TGGAAAGACTC 480  
CAGTGGAAC CTTCTGGAC GGGACAGCTT TGAGGTTCTGT GTTGTGCCT GCCCTGGAG 540  
AGACCCGCCGT ACAGAAGAAG AAAATTCCG CAAAAGGAA GTCCCTTGCC CTGAACCTGCC 600  
CCCAGGGAGC GCAAAGGAGG CGCTGCCAC CTGACACAAGC GCCTCTCCCC CGCAAAAGAA 660  
AAACCACTT GATGGAGAGT ATTTCACCCCT CAAGATCCGC GGGCGTAAC GCTTCGAGAT 720  
GTTCCGGAG CTGAATGAGG CCTTAGAGTT AAAGGATGCC CATTGCTACAG AGGAGTCTGG 780  
AGACAGCAGG GCTCACTCCA GCTAACCTGAA GACCAAGAAG GGCCAGTCTIA CTTCCCCCA 840  
TAAAAAAACA ATGGTCAAGA AAGTGGGGCC TGACTCAGAC TGACATTCTC CACTTCTTGT 900  
TCCCCACTGA CAGGCCCTCA CCCCATCTC TCCCTCCCT GCCTTTGGG TTTGGGTCT 960  
TTGAACCCCT GCTTGCATA GGTGTGGTC AGAAGCACCC AGGACTTCGA TTGCTTTGT 1020  
CCCGGGGCTC CACTGAACAA GTTGGCCTGC ACTGGTGT TGTTGTGGG AGGAGGATGG 1080  
GGAGTAGGAC ATACCAGCTT AGATTAAAG GTTTTACTG TGAGGGATGT TTGGGAGATG 1140  
TAAGAAATGT TCTTGCAGTT AGGGTTAGT TTACAATCAG CCACATTCTA GTAGGGGCC 1200  
CACTTACCG TACTAACCG GGAAGCTGTC CCTCACTGTT GAATTTCCTC TAACTTCAAG 1260

GCCCATATCT	GTGAAATGCT	GGCATTTGCA	CCTACCTCAC	AGAGTGCATT	GTGAGGGTTA	1320
ATGAAATAAT	GTACATCTGG	CCTGAAANACC	ACCTTTTATT	ACATGGGGTC	TAGATGACCC	1380
CCTTGAGGTG	CTTGTCCCT	CTCCCTGTTG	GTGGTGGGT	TGGTAGTTTC	TACAGTTGGG	1440
CAGCTGGTTA	GGTGTAGGTA	GTGTCAAGGT	CTCTGCTGGC	CCAGGAAAT	TCTATCCAGC	1500
CAGTTGTTGG	ACCCCTGGCAC	CTCAAATGAA	ATCTCACCCCT	ACCCACACC	CTGTAAGATT	1560
CTATCTCTTG	TATAGATGAT	CTGGATCCAC	CAAGACTTGT	TTTAGCTAG	GGTCCAATT	1620
CTTTTTCTT	TTTTTTTTT	TTTTTCTTT	TCTTGTGAGAC	TGGGTCTCTT	TGTGCCCCA	1680
GGCTGGAGTG	GAGTGGGTG	ATCTGGCTTA	CTGCAGCCCT	TGCCTCCCCG	GCTCGAGCAG	1740
TCCTGCTCA	GCCTCCGGAG	TAGCTGGAC	CACAGGTTCA	TGCCACCATTG	GCCAGCCAAC	1800
TTTTGCAATGT	TTTGTAGAGA	TGGGTCTCA	CAGTGTGCC	CAGGCTGGTC	TCAAACCTCCT	1860
GGGCTCAGGC	GATCCACCTG	TCTCAGCCTC	CCAGAGTGT	GGGATTACAA	TTGTGAGCCA	1920
CCACGTCAG	CTGGAACGGC	CTACTTTCT	TCCATTCTGC	AAAGCCCTGC	TGCATTATTC	1980
CACCCACCC	TCCACCTGTC	TCCCTCTTT	TTCCTTACCC	CTTTTATAT	ATCAATTCT	2040
TATTTACAA	TAAAATTG	TTATCA				2066

## (2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 4:

## (i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 293 Aminosäuren
- (B) TYP: Aminosäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQ ID NO: 4:

Lys	Thr	Tyr	Gln	Gly	Asn	Tyr	Gly	Phe	His	Leu	Gly	Phe	Leu	Gln	Ser
1			5					10			15				
GLY	Thr	Ala	Lys	Ser	Val	Met	Cys	Thr	Tyr	Ser	Pro	Pro	Leu	Asn	Lys
20							25						30		
Leu	Phe	Cys	Gln	Leu	Ala	Lys	Thr	Cys	Pro	Val	Gln	Leu	Trp	Val	Ser
35							40					45			
Ala	Thr	Pro	Pro	Ala	Gly	Ser	Arg	Val	Arg	Ala	Met	Ala	Ile	His	Lys
50							55					60			
Lys	Ser	Gln	His	Met	Thr	Gly	Val	Val	Arg	Arg	Cys	Pro	His	Glu	
65							70					75			
												80			

DE 696 36 120 T2 2006.11.30

Arg	Cys	Ser	Asp	Gly	Asp	Gly	Leu	Ala	Pro	Pro	Gln	His	Leu	Ile	Arg
85															
Val	Glu	Gly	Asn	Leu	Tyr	Pro	Glu	Tyr	Leu	Glu	Asp	Arg	Gln	Thr	Phe
100															
Arg	His	Ser	Val	Val	Val	Pro	Tyr	Glu	Pro	Pro	Glu	Ala	Gly	Ser	Glu
115															
Tyr	Thr	Thr	Ile	His	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Cys	Asn	Ser	Ser	Cys	Met	Gly
130															
Gly	Met	Asn	Arg	Arg	Pro	Ile	Leu	Thr	Ile	Ile	Thr	Leu	Glu	Asp	Ser
145															
Ser	Gly	Asn	Leu	Leu	Gly	Arg	Asn	Ser	Phe	Glu	Val	Arg	Val	Cys	Ala
165															
Cys	Pro	Gly	Arg	Asp	Arg	Arg	Thr	Glu	Glu	Asn	Phe	Arg	Lys	Lys	
180															
Glu	Val	Leu	Cys	Pro	Glu	Leu	Pro	Pro	Gly	Ser	Ala	Lys	Arg	Ala	Leu
195															
Pro	Thr	Cys	Thr	Ser	Ala	Ser	Pro	Pro	Gln	Lys	Lys	Pro	Leu	Asp	
210															
215															
220															

Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Lys Ile Arg Gly Arg Leu Arg Phe Glu Met  
 225 230 235 240  
 Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Lys Asp Ala His Ala Thr  
 245 250 255 255

Glu Glu Ser Gly Asp Ser Arg Ala His Ser Ser Tyr Leu Lys Ser Lys  
 260 265 270  
 Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Thr Met Val Lys Lys Val  
 275 280 285 285  
 Gly Pro Asp Ser Asp  
 290

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZMERKMALE:
- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
  - (B) TYP: Nucleinsäure
  - (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQ ID NO: 5:

ACTGGCCAAC AACACCA

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQ ID NO: 6:

GCCACGCCCA CACATT

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQ ID NO: 7:

GCCTGTCCCTG GGAGAGACCG

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZMERKMALE:  
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare  
(B) TYP: Nucleinsäure  
(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig  
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQ ID NO: 8:

CCCTTAAGGCC AGGCCACAC

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZMERKMALE:  
(A) LÄNGE: 18 Basenpaare  
(B) TYP: Nucleinsäure  
(C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig  
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQ ID NO: 9:

CACTGCCCAA CAACACCA

17

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 17 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D): TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

GCCACGCCCA CACATT

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D): TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GGTGCATTGG AACGGCGATT

20

20

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 12:

(1) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D): TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

GGGGACAGAA CGTGTGTTTC

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 13:

(1) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D): TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 13:

ACGGATTGG TCGTATTGGG

20

(2) INFORMATIONEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZMERKMALE:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) TYP: Nucleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG : SEQ ID NO: 14:

TGATTGGAGGGATCTCGC

**Patentansprüche**

1. Verwendung eines Expressionskonstrukts, insbesondere eines viralen Expressionskonstrukts, umfassend einen Promotor, der in eukariotischen Zellen funktionell ist, und ein Polynukleotid, das ein funktionelles p53-Polypeptid kodiert, wobei das Polynukleotid sense zu und unter der Kontrolle des Promoters angeordnet ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines menschlichen Individuums mit einem soliden Tumor, wobei der Tumor Zellen umfasst, die ein funktionelles p53-Polypeptid exprimieren.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Medikament an den Tumor *in vivo* zu verabreichen ist, wobei die Verabreichung zur Expression des funktionellen p53-Polypeptids in Zellen des Tumors und zur Hemmung des Tumorzellwachstums führt.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Tumor aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einem Karzinom, einem Gliom, einem Sarkom und einem Melanom.

4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Tumorzelle bösartig ist.
5. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Tumorzelle gutartig ist.
6. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Tumor ein Tumor von Lunge, Haut, Prostata, Leber, Testes, Knochen, Gehirn, Darm, Pankreas, Kopf und Hals, Magen, Eierstock, Brust oder Blase ist.
7. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das virale Expressionskonstrukt aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einem retroviralen Vektor, einem adenoviralen Vektor und einem adeno-assoziierten viralen Vektor.
8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei der virale Vektor ein replikationsdefizienter adenoviraler Vektor ist.
9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei dem replikationsdefizienten adenoviralen Vektor mindestens ein Teil der E1-Region fehlt.
10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei der Promotor ein CMV IE-Promotor ist.
11. Verwendung nach Anspruch 8, wobei der Expressionsvektor an den Tumor mindestens ein zweites Mal zu verabreichen ist.
12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei der Tumor nach mindestens einer zweiten Verabreichung reseziert wird und wobei im Anschluss an die Resektion eine zusätzliche Verabreichung durchgeführt wird.
13. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Expressionskonstrukt in einem Volumen von etwa 3 ml bis etwa 10 ml zu verabreichen ist.
14. Verwendung nach Anspruch 11, wobei die bei jedem Kontaktieren zu verabreichende Menge an Adenovirus zwischen etwa  $10^7$  und  $10^{12}$  pfu liegt.
15. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Medikament in eine natürliche oder künstliche Körperhöhle zu injizieren ist.
16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei die Injektion die kontinuierliche Perfusion der natürlichen oder künstlichen Körperhöhle umfasst.
17. Verwendung nach Anspruch 15, wobei das Medikament in eine künstliche Körperhöhle zu injizieren ist, die von einer Tumorexzision herrührt.
18. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das p53-kodierende Polynucleotid so markiert wird, dass die Expression von p53 aus dem Expressionskonstrukt nachgewiesen werden kann.
19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die Markierung ein kontinuierliches Epitop ist.
20. Verwendung nach Anspruch 2, wobei der Tumor mit dem Expressionskonstrukt mindestens zweimal zu kontaktieren ist.
21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Mehrfachinjektionen Volumina von etwa 0,1–0,5 ml in einem Abstand von etwa 1 cm umfassen.
22. Verwendung nach Anspruch 2, wobei die Verabreichung des Medikaments außerdem das Kontaktieren des Tumors mit einem DNA-schädigenden Mittel umfasst.
23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei das DNA-schädigende Mittel ein radiotherapeutisches Mittel ist.
24. Verwendung nach Anspruch 23, wobei das radiotherapeutische Mittel aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus  $\gamma$ -Bestrahlung, Röntgen-Bestrahlung, UV-Bestrahlung und Mikrowellen.
25. Verwendung nach Anspruch 22, wobei das DNA-schädigende Mittel ein chemotherapeutisches Mittel ist.

26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei das chemotherapeutische Mittel aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Adriamycin, 5-Fluoruracil, Etoposid, Camptothecin, Actinomycin-D, Mitomycin C, Verapamil, Doxorubicin, Podophyllotoxin und cis-Platin.
27. Verwendung nach Anspruch 2, wobei die Verabreichung des Medikaments außerdem das Kontaktieren des Tumors mit einem Cytokin umfasst.
28. Verwendung nach Anspruch 2, wobei die Verabreichung des Medikaments außerdem das Kontaktieren des Tumors mit einem zweiten therapeutischen Gen, das anders ist als ein Gen das ein p53-Polypeptid kodiert, umfasst.
29. Verwendung nach Anspruch 28, wobei das zweite therapeutische Gen aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einem Dp-Gen, p21, p16, p27, E<sub>2</sub>F, Rb, APC, DC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, FCC, MCC, ras, myc, neu, raf, erb, src, fms, jun, trk, ret, gsp, hst, bcl, abl, Bax, Bcl-X<sub>s</sub> und E1A.
30. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Tumor in einer Körperhöhle, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Mund, Pharynx, Ösophagus, Larynx, Trachea, Pleurahöhle, Peritonealhöhle, Blaseninnerem und Darmlumen, lokalisiert ist.
31. Verwendung nach Anspruch 11, wobei der Tumor mit dem Expressionskonstrukt mindestens sechsmal innerhalb eines zweiwöchigen Behandlungsregimes zu kontaktieren ist.
32. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Medikament an ein Tumorbett zu verabreichen ist, das sich durch Resektion des Tumors ergibt, wobei die Verabreichung zur Expression des funktionellen p53-Polypeptids in den Tumorzellen und zur Hemmung ihres Wachstums führt.
33. Verwendung nach Anspruch 32, wobei das mikroskopische restliche Tumorzellenwachstum in einem menschlichen Individuum gehemmt wird.
34. Verwendung nach Anspruch 32, wobei der resektierbare Tumor ein Plattenepithelkarzinom ist.
35. Verwendung nach Anspruch 32, wobei das endogene p53 des resektierbaren Tumors vom Wildtyp ist.
36. Verwendung nach Anspruch 32, wobei der Tumor ein Tumor von Lunge, Haut, Prostata, Leber, Testes, Knochen, Gehirn, Darm, Pankreas, Kopf und Hals, Magen, Eierstock, Brust oder Blase ist.
37. Verwendung nach Anspruch 32, wobei das virale Expressionskonstrukt aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einem retroviren Vektor, einem adenoviralen Vektor und einem adeno-assoziierten viralen Vektor.
38. Verwendung nach Anspruch 37, wobei der adenovirale Vektor ein replikationsdefizienter adenoviraler Vektor ist.
39. Verwendung nach Anspruch 38, wobei dem replikationsdefizienten adenoviralen Vektor mindestens ein Teil der E1-Region fehlt.
40. Verwendung nach Anspruch 32, wobei der Promotor ein CMV IE-Promotor ist.
41. Verwendung nach Anspruch 32, wobei das resultierende Tumorbett mit dem Expressionskonstrukt mindestens zweimal zu kontaktieren ist.
42. Verwendung nach Anspruch 32, wobei das Expressionskonstrukt mit dem Tumorbett vor dem Schließen der Inzision zu kontaktieren ist.
43. Verwendung nach Anspruch 38, wobei das Tumorbett mit etwa 10<sup>6</sup> bis etwa 10<sup>9</sup> infektiösen adenoviralen Teilchen zu kontaktieren ist.
44. Verwendung nach Anspruch 41, wobei die Verabreichung des Medikaments außerdem das Kontaktieren des Tumors mit dem Expressionskonstrukt vor Resektion des Tumors umfasst.

45. Verwendung nach Anspruch 44, wobei der Tumor mit dem Expressionskonstrukt zu injizieren ist.
46. Verwendung nach Anspruch 45, wobei der Tumor mit etwa  $10^6$  bis etwa  $10^9$  infektiösen adenoviralen Teilchen zu injizieren ist.
47. Verwendung nach Anspruch 45, wobei der Tumor mit insgesamt etwa 1 ml bis etwa 10 ml zu injizieren ist.
48. Verwendung nach Anspruch 45, wobei der Tumor mindestens zweimal zu injizieren ist.
49. Verwendung nach Anspruch 48, wobei die Injektionen Volumina von jeweils etwa 0,1 ml bis etwa 0,5 ml in einem Abstand von etwa 1 cm umfassen.
50. Verwendung nach Anspruch 32, wobei das resultierende Tumorbett mit dem Expressionskonstrukt über einen Katheter zu kontaktieren ist.
51. Verwendung nach Anspruch 48, wobei das Kontaktieren etwa  $10^6$  bis etwa  $10^9$  infektiöser adenoviraler Teilchen einschließt.
52. Verwendung nach Anspruch 48, wobei das Expressionskonstrukt mit dem Tumor in insgesamt etwa 3 ml bis etwa 10 ml zu kontaktieren ist.
53. Verwendung nach Anspruch 32, wobei das p53-Polynucleotid so markiert wird, dass die Expression eines p53-Polypeptids nachgewiesen werden kann.
54. Verwendung nach Anspruch 53, wobei die Markierung ein kontinuierliches Epitop ist.
55. Verwendung nach Anspruch 32, wobei die Verabreichung des Medikaments außerdem das Kontaktieren des Tumors mit einem DNA-schädigenden Mittel umfasst.
56. Verwendung nach Anspruch 55, wobei das DNA-schädigende Mittel vor der Resektion in Kontakt zu bringen ist.
57. Verwendung nach Anspruch 55, wobei das DNA-schädigende Mittel nach der Resektion zu kontaktieren ist.
58. Verwendung nach Anspruch 55, wobei das DNA-schädigende Mittel vor und nach der Resektion in Kontakt zu bringen ist.
59. Verwendung nach Anspruch 55, wobei das DNA-schädigende Mittel ein radiotherapeutisches Mittel ist.
60. Verwendung nach Anspruch 59, wobei das radiotherapeutische Mittel aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus  $\gamma$ -Bestrahlung, Röntgen-Bestrahlung, UV-Bestrahlung und Mikrowellen.
61. Verwendung nach Anspruch 55, wobei das DNA-schädigende Mittel ein chemotherapeutisches Mittel ist.
62. Verwendung nach Anspruch 61, wobei das chemotherapeutische Mittel aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Adriamycin, 5-Fluoracil, Etoposid, Camptothecin, Actinomycin-D, Mitomycin C, Verapamil, Doxorubicin, Podophyllotoxin und cis-Platin.
63. Verwendung nach Anspruch 32, wobei die Verabreichung des Medikaments außerdem das Kontaktieren des Tumors mit einem Cytokin umfasst.
64. Verwendung nach Anspruch 63, wobei das Cytokin aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, TGF- $\beta$ , GM-CSF, M-CSF, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$ .
65. Verwendung nach Anspruch 32, wobei die Verabreichung des Medikaments außerdem das Kontaktieren des Tumors mit einem zweiten therapeutischen Gen, das anders ist als ein Gen, das ein p53-Polypeptid

kodiert, umfasst.

66. Verwendung nach Anspruch 65, wobei das zweite therapeutische Gen aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einem Dp-Gen, p21, p16, p27, E<sub>2</sub>F, Rb, APC, DC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, FCC, MCC, ras, myc, neu, raf, erb, src, fms, jun, trk ret, gsp, hst, bcl, abl, Bax, Bcl-X<sub>s</sub> und E1A.

67. Verwendung nach Anspruch 32, wobei der Tumor in einer Körperhöhle lokalisiert ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Mund, Pharynx, Ösophagus, Larynx, Trachea, Pleurahöhle, Peritonealhöhle, Blaseninnerem und Darmlumen.

68. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Medikament direkt an einen operativ freigelegten soliden Tumor zu verabreichen ist, wobei die Verabreichung zur Expression des funktionellen p53-Polypeptids in den Tumorzellen und zur Hemmung ihres Wachstums führt.

69. Verwendung nach Anspruch 68, wobei der Tumor bösartig ist.

70. Verwendung nach Anspruch 68, wobei der Tumor ein Plattenepithelkarzinom ist.

71. Verwendung nach Anspruch 68, wobei der Tumor gutartig ist.

72. Verwendung nach Anspruch 68, wobei der Tumor ein Tumor von Lunge, Haut, Prostata, Leber, Testes, Knochen, Gehirn, Darm, Pankreas, Kopf und Hals, Magen, Eierstock, Brust oder Blase ist.

73. Verwendung nach Anspruch 68, wobei das virale Expressionskonstrukt aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einem retroviralen Vektor, einem adenoviralen Vektor und einem adeno-assoziierten viralen Vektor.

74. Verwendung nach Anspruch 73, wobei der adenovirale Vektor ein replikationsdefizienter adenoviraler Vektor ist.

75. Verwendung nach Anspruch 74, wobei dem replikationsdefizienten adenoviralen Vektor mindestens ein Teil der E1-Region fehlt.

76. Verwendung nach Anspruch 68, wobei der Promotor ein CMV IE-Promotor ist.

77. Verwendung nach Anspruch 68, wobei der Tumor mit dem Expressionskonstrukt mindestens zweimal zu kontaktieren ist.

78. Verwendung nach Anspruch 68, wobei das Expressionskonstrukt mit dem Tumor vor dem Schließen der Inzision zu kontaktieren ist.

79. Verwendung nach Anspruch 74, wobei der Tumor mit etwa 10<sup>6</sup> bis etwa 10<sup>9</sup> infektiösen adenoviralen Teilchen zu kontaktieren ist.

80. Verwendung nach Anspruch 68, wobei der Tumor mit dem Expressionskonstrukt in insgesamt etwa 1 ml bis etwa 10 ml zu kontaktieren ist.

81. Verwendung nach Anspruch 68, wobei mindestens zweimal in den Tumor zu injizieren ist.

82. Verwendung nach Anspruch 81, wobei die Injektionen Volumina von jeweils etwa 0,1 bis etwa 0,5 ml in einem Abstand von etwa 1 cm umfassen.

83. Verwendung nach Anspruch 68, wobei der Tumor mit dem Expressionskonstrukt über einen Katheter zu kontaktieren ist.

84. Verwendung nach Anspruch 83, wobei der Tumor mit etwa 10<sup>6</sup> bis etwa 10<sup>9</sup> infektiösen adenoviralen Teilchen zu kontaktieren ist.

85. Verwendung nach Anspruch 83, wobei der Tumor mit einem Expressionskonstrukt in insgesamt etwa 3 ml bis etwa 10 ml zu kontaktieren ist.

86. Verwendung nach Anspruch 68, wobei das p53-Polynucleotid so markiert wird, dass die Expression eines p53-Polypeptids nachgewiesen werden kann.
87. Verwendung nach Anspruch 86, wobei die Markierung ein kontinuierliches Epitop ist.
88. Verwendung nach Anspruch 68, wobei die Verabreichung des Medikaments außerdem das Kontaktieren des Tumors mit einem DNA-schädigenden Mittel umfasst.
89. Verwendung nach Anspruch 88, wobei das DNA-schädigende Mittel mit dem Tumor vor der Resektion zu kontaktieren ist.
90. Verwendung nach Anspruch 88, wobei das DNA-schädigende Mittel mit dem Tumor nach der Resektion zu kontaktieren ist.
91. Verwendung nach Anspruch 88, wobei das DNA-schädigende Mittel mit dem Tumor vor und nach der Resektion zu kontaktieren ist.
92. Verwendung nach Anspruch 88, wobei das DNA-schädigende Mittel ein radiotherapeutisches Mittel ist.
93. Verwendung nach Anspruch 92, wobei das radiotherapeutische Mittel aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus  $\gamma$ -Bestrahlung, Röntgen-Bestrahlung, UV-Bestrahlung und Mikrowellen.
94. Verwendung nach Anspruch 88, wobei das DNA-schädigende Mittel ein chemotherapeutisches Mittel ist.
95. Verwendung nach Anspruch 94, wobei das chemotherapeutische Mittel aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Adriamycin, 5-Fluoruracil, Etoposid, Camptothecin, Actinomycin-D, Mitomycin C, Verapamil, Doxorubicin, Podophyllotoxin und cis-Platin.
96. Verwendung nach Anspruch 68, wobei die Verabreichung des Medikaments außerdem das Kontaktieren des Tumors mit einem Cytokin umfasst.
97. Verwendung nach Anspruch 96, wobei das Cytokin aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, TGF- $\beta$ , GM-CSF, M-CSF, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$ .
98. Verwendung nach Anspruch 68, wobei die Verabreichung des Medikaments außerdem das Kontaktieren des Tumors mit einem zweiten therapeutischen Gen, das anders ist als ein Gen, das ein p53-Polypeptid kodiert, umfasst.
99. Verwendung nach Anspruch 98, wobei das zweite therapeutische Gen aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einem Dp-Gen, p21, p16, p27, E<sub>2</sub>F, Rb, APC, DC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, FCC, MCC, ras, myc, neu, raf, erb, src, fms, jun, trk, ret, gsp, hst, bcl, abl, Bax, Bcl-X<sub>s</sub> und E1A.
100. Verwendung nach Anspruch 68, wobei der Tumor in einer Körperhöhle lokalisiert ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Mund, Pharynx, Ösophagus, Larynx, Trachea, Pleurahöhle, Peritonealhöhle, Blaseninnerem und Darmlumen.
101. Verwendung nach Anspruch 68, die außerdem den Schritt der kontinuierlichen Perfusion einer Tumorstelle in dem Patienten mit dem Expressionskonstrukt, insbesondere mit dem viralen Expressionskonstrukt, umfasst.
102. Verwendung nach Anspruch 101, wobei der Tumor bösartig ist.
103. Verwendung nach Anspruch 101, wobei der Tumor ein Plattenepithelkarzinom ist.
104. Verwendung nach Anspruch 101, wobei der Tumor gutartig ist.
105. Verwendung nach Anspruch 101, wobei das endogene p53 des Tumors vom Wildtyp ist.

106. Verwendung nach Anspruch 101, wobei der Tumor ein Tumor von Lunge, Haut, Prostata, Leber, Testes, Knochen, Gehirn, Darm, Pankreas, Kopf und Hals, Magen, Eierstock, Brust oder Blase ist.

107. Verwendung nach Anspruch 101, wobei das virale Expressionskonstrukt aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einem retroviralen Vektor, einem adenoviralen Vektor und einem adeno-assoziierten viralen Vektor.

108. Verwendung nach Anspruch 107, wobei der adenovirale Vektor ein replikationsdefizienter adenoviraler Vektor ist.

109. Verwendung nach Anspruch 108, wobei dem replikationsdefizienten adenoviralen Vektor mindestens ein Teil der E1-Region fehlt.

110. Verwendung nach Anspruch 101, wobei der Promotor ein CMV IE-Promotor ist.

111. Verwendung nach Anspruch 101, wobei die Tumorstelle etwa 1 bis etwa 2 h zu perfundieren ist.

112. Verwendung nach Anspruch 101, wobei die Tumorstelle mit dem Expressionsvektor über einen Katheter zu kontaktieren ist.

113. Verwendung nach Anspruch 101, wobei das p53-Polynucleotid so markiert wird, dass die Expression eines p53-Polypeptids nachgewiesen werden kann.

114. Verwendung nach Anspruch 113, wobei die Markierung ein kontinuierliches Epitop ist.

115. Verwendung nach Anspruch 101, wobei die Verabreichung des Medikaments außerdem das Kontaktieren des Tumors mit einem DNA-schädigenden Mittel umfasst.

116. Verwendung nach Anspruch 115, wobei die Tumorstelle mit dem DNA-schädigende Mittel vor der Resektion zu kontaktieren ist.

117. Verwendung nach Anspruch 115; wobei die Tumorstelle mit dem DNA-schädigenden Mittel nach der Resektion zu kontaktieren ist.

118. Verwendung nach Anspruch 115, wobei die Tumorstelle mit dem DNA-schädigenden Mittel vor und nach der Resektion zu kontaktieren ist.

119. Verwendung nach Anspruch 115, wobei das DNA-schädigende Mittel ein radiotherapeutisches Mittel ist.

120. Verwendung nach Anspruch 119, wobei das radiotherapeutische Mittel aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus  $\gamma$ -Strahlung, X-Strahlung, UV-Strahlung und Mikrowellen.

121. Verwendung nach Anspruch 115, wobei das DNA-schädigende Mittel ein chemotherapeutisches Mittel ist.

122. Verwendung nach Anspruch 121, wobei das chemotherapeutische Mittel aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Adriamycin, 5-Fluoruracil, Etoposid, Camptothecin, Actinomycin-D, Mitomycin C, Verapamil, Doxorubicin, Podophyllotoxin und cis-Platin.

123. Verwendung nach Anspruch 101, wobei die Verabreichung des Medikaments außerdem das Kontaktieren des Tumors mit einem Cytokin umfasst.

124. Verwendung nach Anspruch 123, wobei das Cytokin aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, TGF- $\beta$ , GM-CSF, M-CSF, TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , LAF, TCGF, BCGF, TRF, BAF, BDG, MP, LIF, OSM, TMF, PDGF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$ .

125. Verwendung nach Anspruch 68, wobei die Verabreichung des Medikaments außerdem das Kontaktieren des Tumors mit einem zweiten therapeutischen Gen, das anders ist als ein Gen, das ein p53-Polypeptid kodiert, umfasst.

126. Verwendung nach Anspruch 125, wobei das zweite therapeutische Gen aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einem Dp-Gen, p21, p16, p27, E<sub>2</sub>F, Rb, APC, DC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, FCC, MCC, ras, myc, neu, raf, erb, src, fms, jun, trk ret, gsp, hst, bcl, abl, Bax, Bcl-X<sub>s</sub> und E1A.

127. Verwendung nach Anspruch 101, wobei der Tumor in einer Körperhöhle lokalisiert ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Mund, Pharynx, Ösophagus, Larynx, Trachea, Pleurahöhle, Peritonealhöhle, Blaseninnerem und Darmlumen.

128. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Expressionskonstrukt topisch zu verabreichen ist.

129. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Expressionskonstrukt intratumoral zu verabreichen ist.

130. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Expressionskonstrukt intravenös zu verabreichen ist.

131. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Expressionskonstrukt oral zu verabreichen ist.

132. Verwendung nach Anspruch 68, wobei das Expressionskonstrukt topisch zu verabreichen ist.

133. Verwendung nach Anspruch 68, wobei das Expressionskonstrukt intratumoral zu verabreichen ist.

134. Verwendung nach Anspruch 68, wobei das Expressionskonstrukt intravenös zu verabreichen ist.

135. Verwendung nach Anspruch 68, wobei das Expressionskonstrukt oral zu verabreichen ist.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

FIG 1

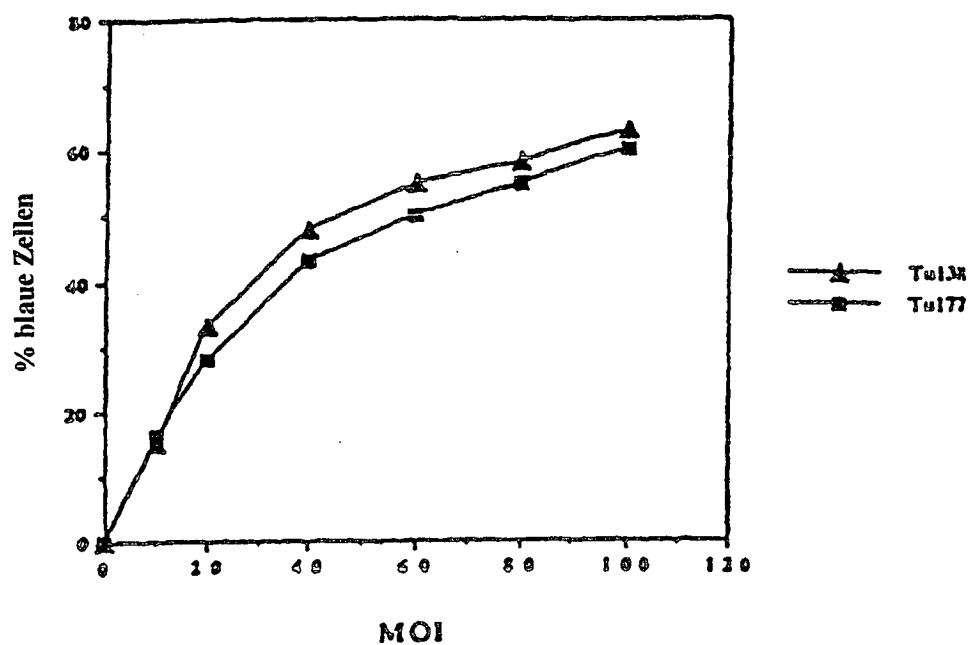


FIG 2A

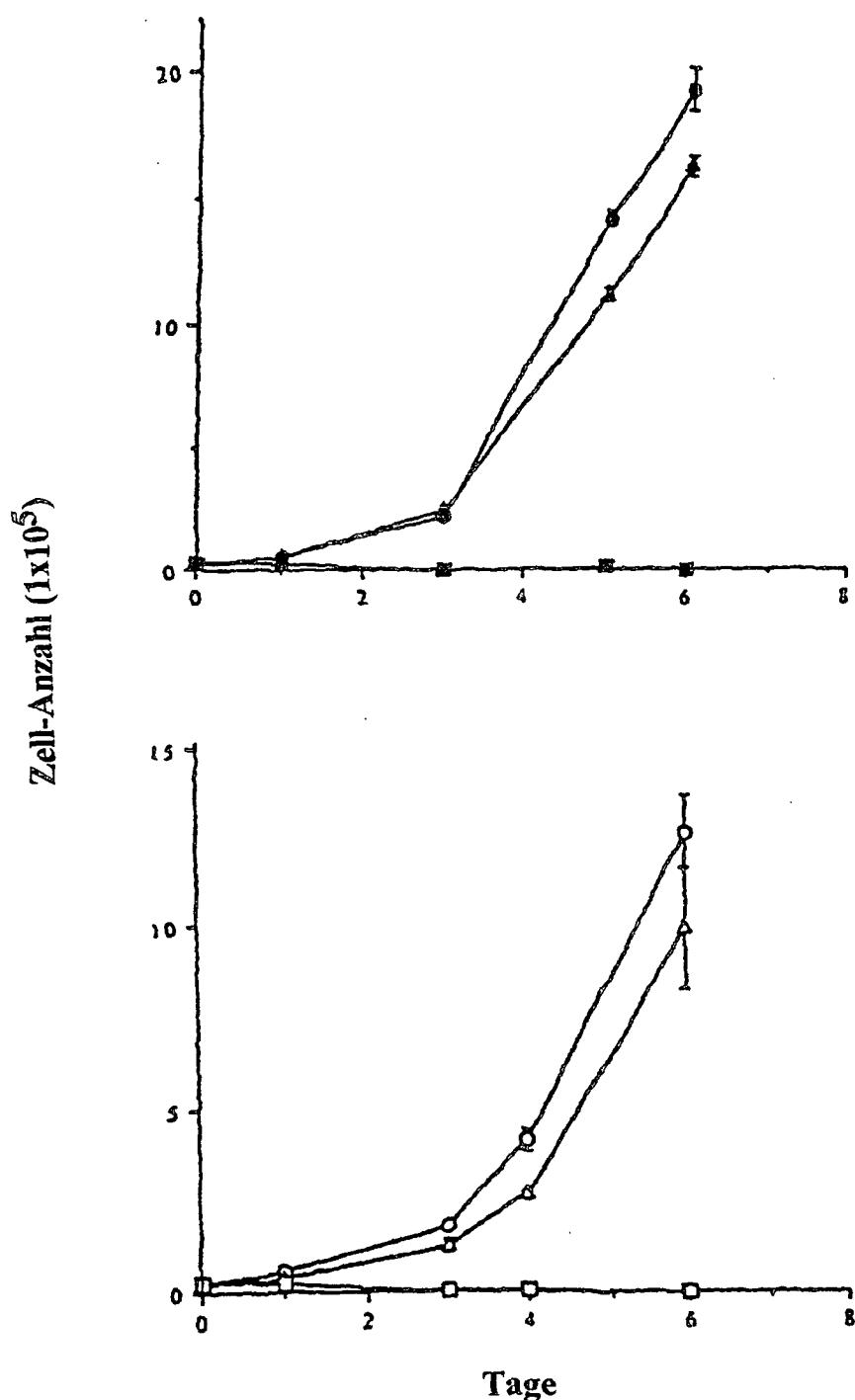


FIG 2B

FIG 3A

FIG 3B

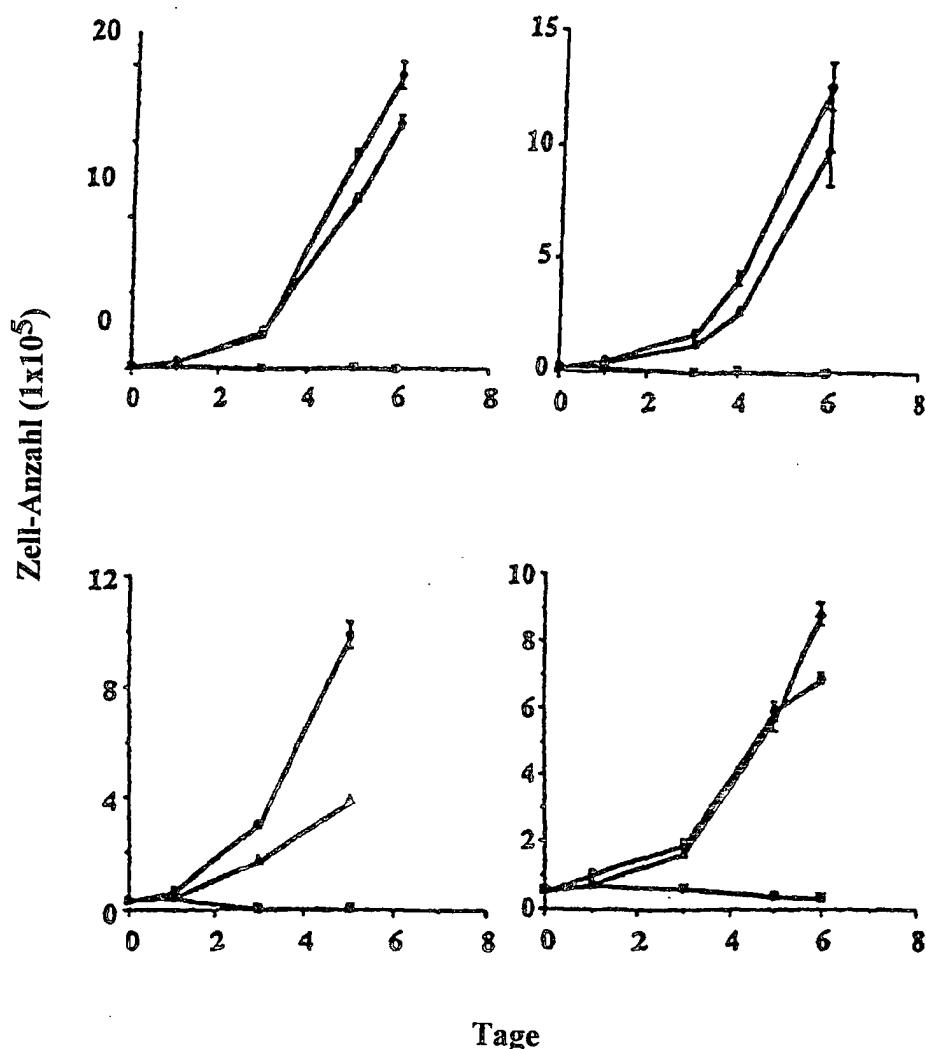


FIG 3C

FIG 3D

FIG 4

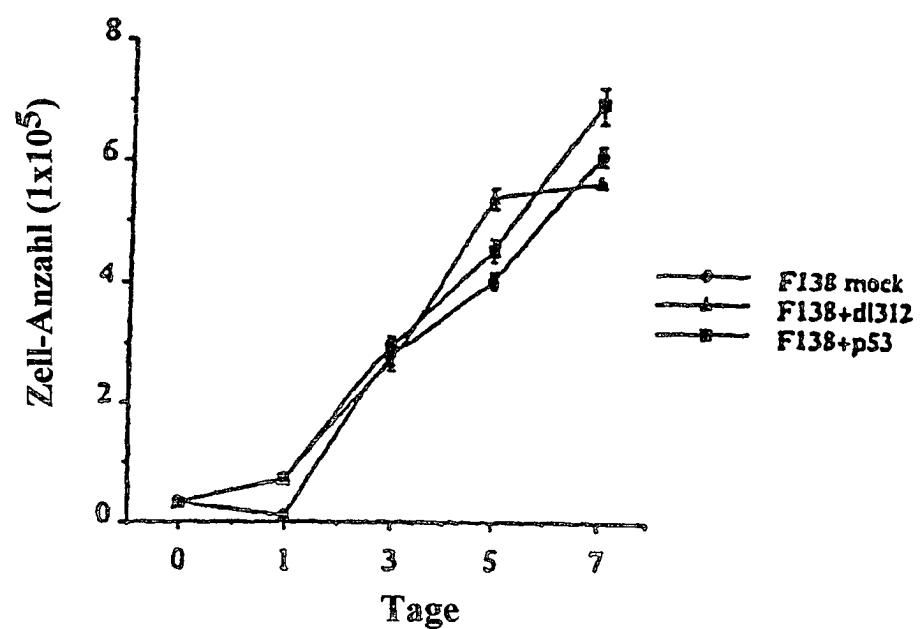


FIG 5A

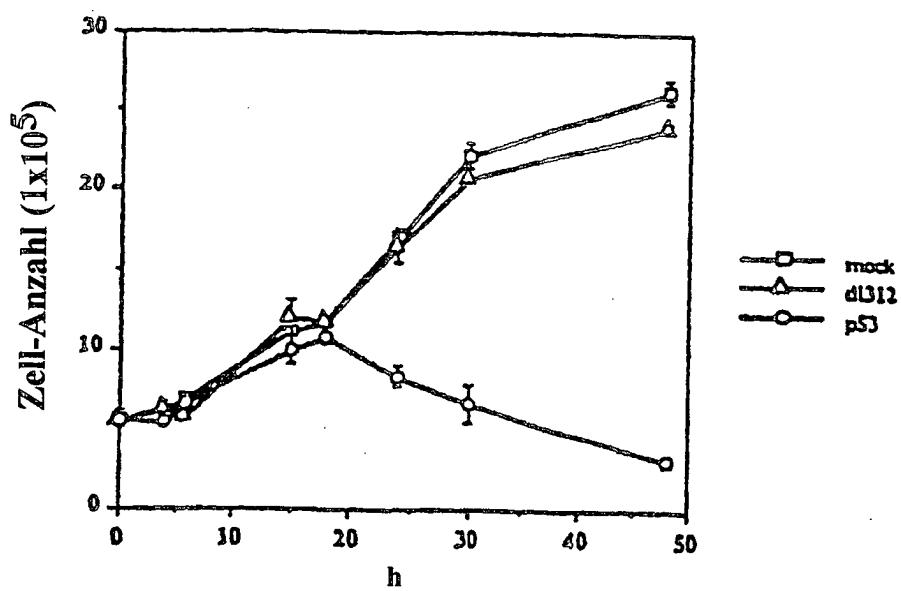
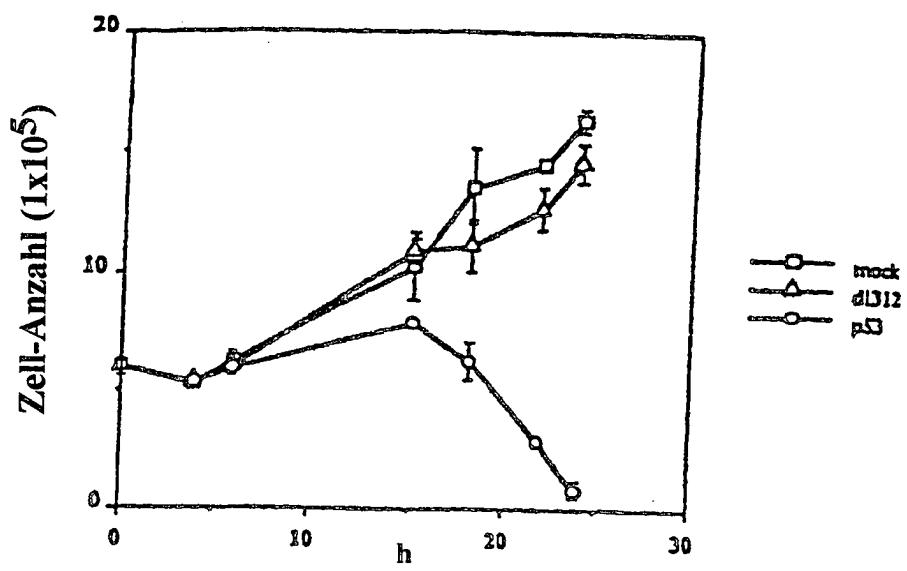


FIG 5B

FIG 6A

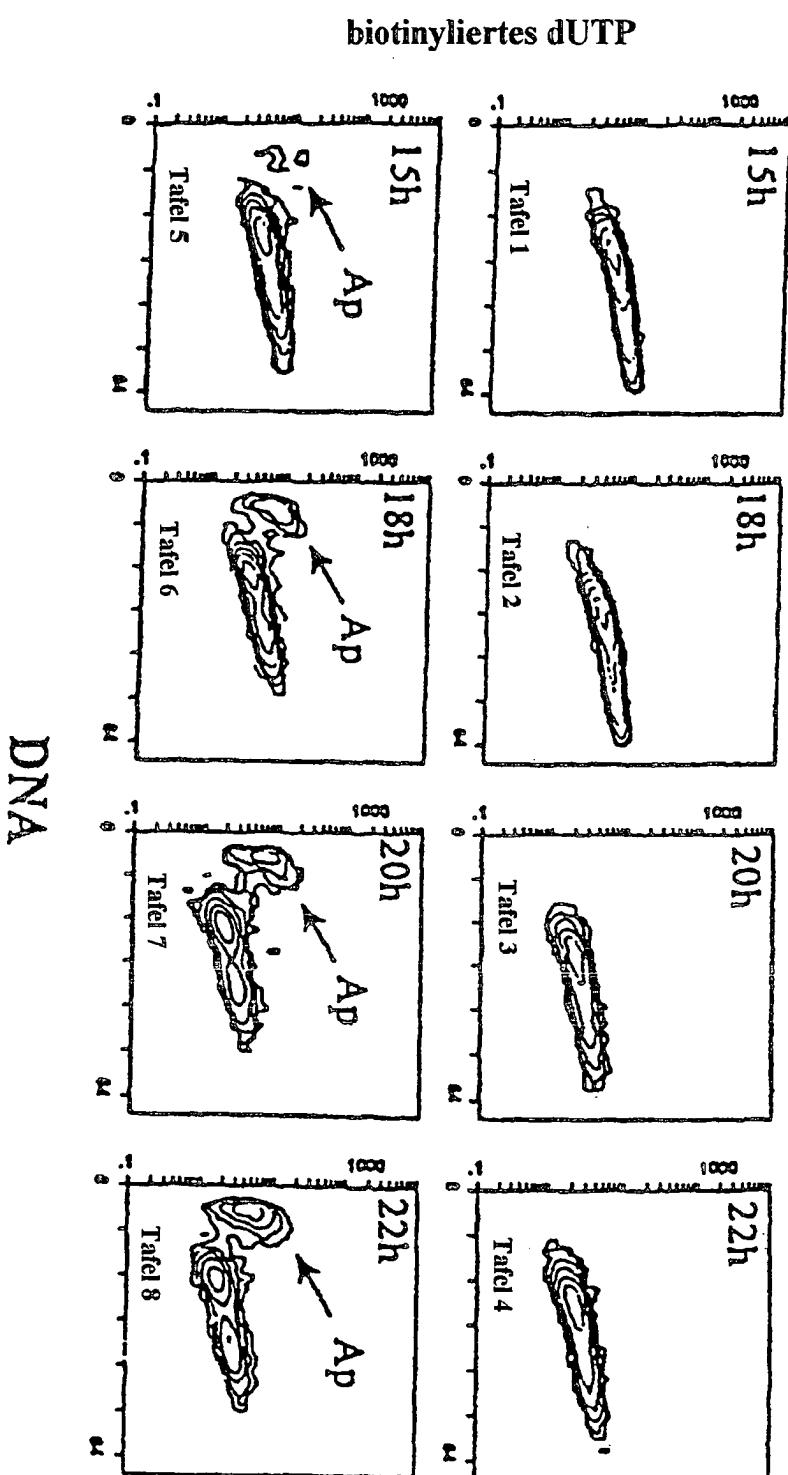


FIG 6B

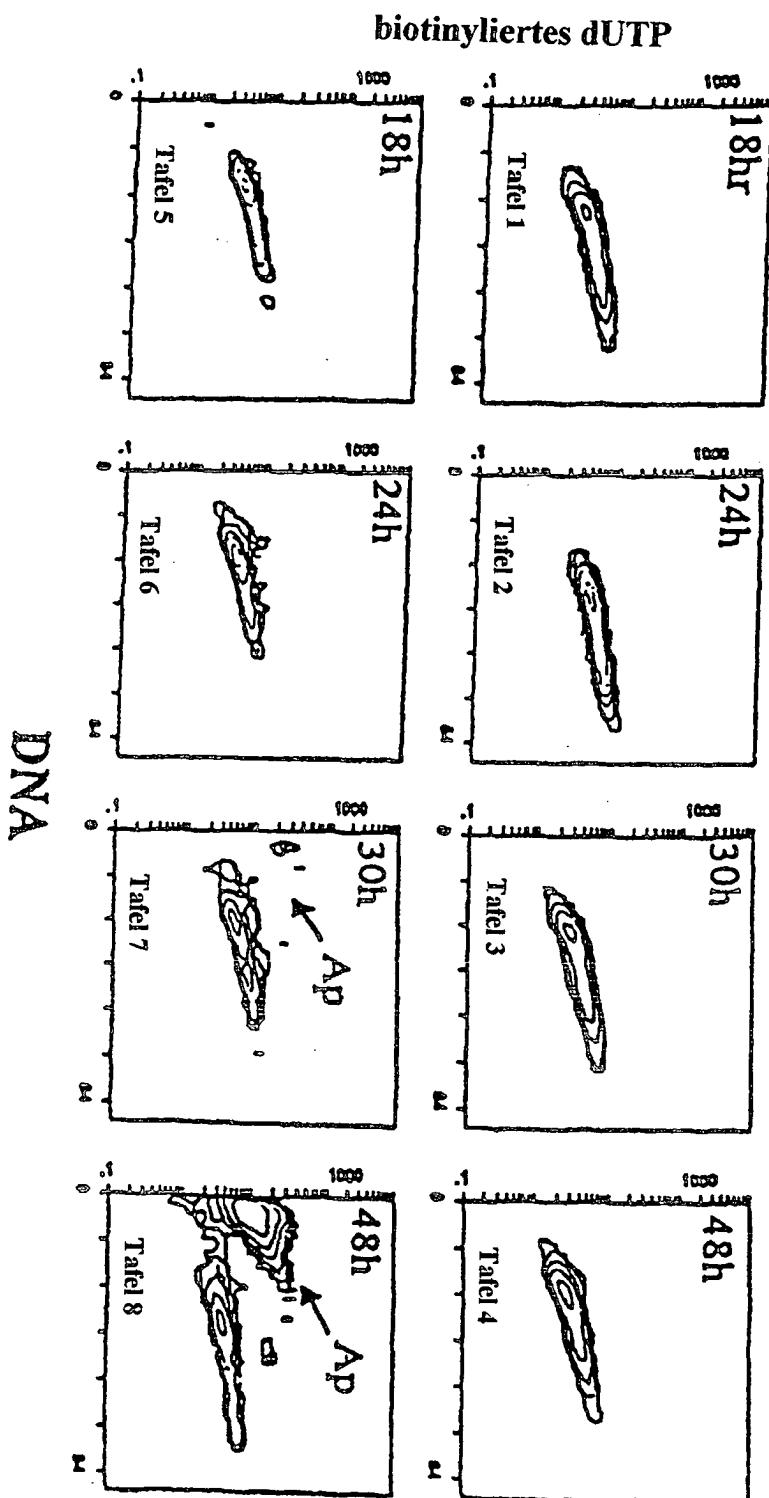


FIG 7A

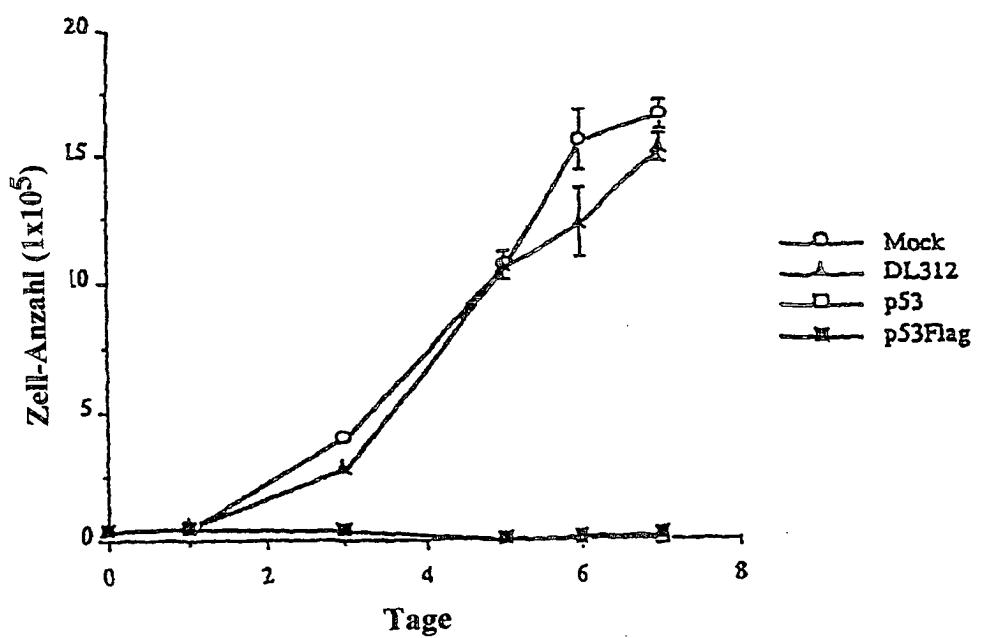
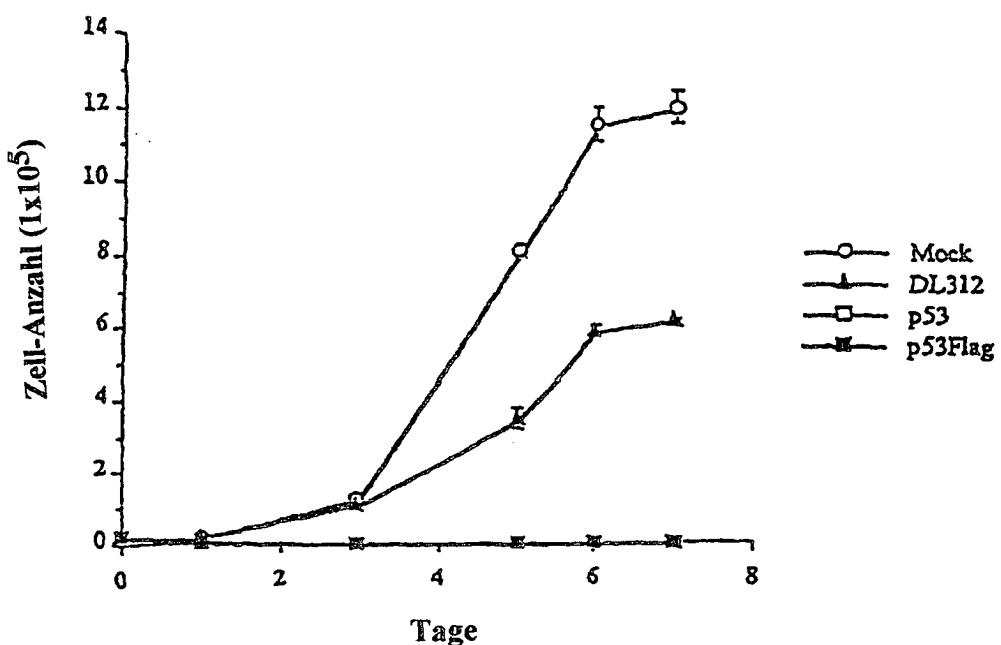


FIG 7B