

1/48/2001

Zárójelentés: 2001. május 15.-2004. december 31.

**RP.9. Rosszindulatú agydaganatok génterápiájának
bevezetése**

**Dr. Nyáry István
Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet**

RP.9. A génterápia klinikai bevezetése a rosszindulatú agydaganatok kezelésére.

Témavezető: Nyáry István, Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet

*9.B. Az emberi GM-CSF-et kódoló adenovírus alapú vektor klinikai minőségű előállítására.
Témavezetők: Sáfrány Géza, OKK, Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet, Mécs Imre, Bay Z. Biotechnológiai Kutató Intézet*

Az **elmúlt jelentési periódusban (2001-2002)** egy új eljárást dolgoztunk ki a klinikai minőségű adenovírus vektor előállítására.

A betegből izolált glioma sejtekbe az emberi GM-CSF-et kódoló gént egy, a klinikai protokollban leírt adenovírus alapú vektorrendszer segítségével visszük be. Az adenovírus alapú vektor nagy mennyiségben történő előállítása az OKK – Országos Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet Molekuláris és Tumorsugárbiológia Osztályán (OSSKI) történik (felelős: Dr. Sáfrány Géza, főosztályvezető-főorvos). A vektor minőségi követelményeinek ellenőrzése az OSSKI-ban, és a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítványnál (BAYBIO) történik. Amennyiben a vektor ezen vizsgálatok alapján megfelel a klinikai felhasználás paramétereinek a minőségi tényezők végső ellenőrzése, a klinikai felhasználási engedély kiadása a Johan Béla Országos Epidemiológiai Központ Virologiai Főosztályán (OEK-VF), Berencsi György, főosztályvezető főorvos vezetésével történik.

Az adenovírus alapú vektor előállítása

Az adenovírus alapú vektor nagy mennyiségű előállítása két lépésben történik. Az első lépésben 8×10^6 HEK 293N3S sejtet oltunk ki Joklik módosította MEM médiumban (+10% főtális borjú szérum, Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B) 75 cm^2 alapterületű tenyésztő flaskában. Huszonnégy órával később a sejtekről a médiumot leöntjük és 4 ml szérummentes médiumban 4×10^7 (5 vírus / sejt) vírus vektort adunk. Egy órával később a sejtekhez 0,4 ml főtális borjú szérumot és 11 ml 10% szérumot (+Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B) tartalmozó médiumot adunk. A sejteket 48 órán át $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáljuk. Negyvennyolc óra elteltével a sejtekben az adenovírus vektor szaporodása következtében teljes citopátiás hatás következik be. A sejteket és a sejt-kultúra médiumot steril centrifugacsőbe visszük át és $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ -on fagyasztjuk, majd $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on felolvasztjuk. A fagyasztást és felolvasztást 3-szor ismételjük. A vírusvektor tartalmú szuszpenziót 1 ml-es részletekben $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároljuk. A vírus titerét plaque assay-vel határozzuk meg (ld. később).

Második lépésben, a vírus vektor nagy mennyiségű előállítása történik. Ennek során a HEK-293N3S sejteket szuszpenziós kultúrában, a korábban említett Joklik MEM médiumban (+10% főtális borjú szérum, Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B), állandó keverés mellett 3 literes tenyésztő edényben tartjuk fent. Kettő liter térfogatú, 5×10^5 sejt/ml tartalmú kultúrához 1 liter szérum mentes Joklik médiumot és 5 vírus/sejt arányban az első lépésben előállított vírus vektort adjuk. Negyvennyolc óra elteltével a vírus vektor szaporodása következtében a sejteken teljes citopátiás hatás figyelhető meg. A sejteket ekkor steril körülmények között végzett centrifugálással begyűjtjük, a szintén vírus tartalmú szupernatánst is félretesszük. A sejteket 50 ml steril 10 mM TRIS, pH 8,0 tartalmú oldatban szuszpendáljuk. A vírus vektor sejtekből való kiszabadítása érdekében a sejteket $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ -on lefagyasztjuk, majd $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on felolvasztjuk. A fagyasztást és felolvasztást 3-szor ismételjük. A sejt-suszpenziót centrifugáljuk, az üledéket eldobjuk, a szupernatánst a korábban begyűjtött szupernatánssal egyesítjük. A szupernatánsból a vírus vektort a BD Biosciences Adeno-X Virus Purification Mega kitjével állítjuk elő. Először a sejt-törmelék eltávolítására a vírustartalmú oldatot $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ pórusú szűrőn steril körülmények között átszűrjük. Ezt követően a sejtekből származó törmelék DNS eltávolítására az oldatot 10 U/ml Deoxyribonuklease I-el (SIGMA) kezeljük $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on 30 percig, majd az oldatot egy-egy

arányban keverjük a gyártó (BD Biosciences) által szolgáltatott hígító oldattal. A keveréket steril körülmények között a BD Adeno-X Purification Filter-re szívjuk, majd a filtert a gyártó által szolgáltatott oldatokkal mossuk és a vírus vektort a filterről leoldjuk. Végül plaque assay-vel meghatározzuk az adenovírus vektor titerét. A klinikai felhasználás előtt ellenőrizzük a későbbiekben ismertetett minőségi paramétereit.

Az adenovírus alapú vektor titerének meghatározása

A vírus titer meghatározására HEK 293 sejteket 60 mm átmérőjű petri csészére oltjuk 10% főtális borjú szérum tartalmú DME médiumban. Amikor a sejtek a tenyésztő edény 70-80%-át betöltik, a médiumot leszívjuk és a sejtekhez 0,4 ml szérum mentes médiumban különböző vírus-hígításokat adunk. Egy órást 37 °C-on történő inkubációt követően a sejtekhez 5 ml lágy agart (0,5%) és 2% főtális borjú szérumot tartalmazó DME-t adunk szobahőmérsékleten. Az agar dermedését követően a petri csészéket 37 °C-os széndioxid inkubátorba tesszük. Tíz-tizen négy nap elteltével, megszámláljuk a kialakult plaque-okat és a hígítást figyelembe véve, meghatározzuk a vírus vektor titerét.

A klinikai felhasználás előtt a vektor előállítói által vizsgált minőségi paraméterek

1. Szaporodásra képes adenovírus vektorok jelenlétének kizárása

Az adenovírusok szaporodásához elengedhetetlen az E1A és E1B fehérjéket kódoló génszakaszok jelenléte. E génszakaszokat eltávolítottuk a vektorból, és ezek helyébe klónoztuk az emberi GM-CSF gén cDNS-ét. Elméletileg nem kizárt, hogy a vírus vektor nagymennyiségben történő előállítása során e régiók a 293-as sejtek DNS-ével történő esetleges rekombináció miatt vissza kerülnek a vektorba. Ezt kizárandó két vizsgálatot végzünk: az OSSKI-ban nagy érzékenységű polimeráz láncreakcióval nézzük az E1A és E1B régió jelenlétét a vektor preparátumban. A BAYBIO-ban a vektort HEP2 sejteken tenyészítik. Itt a vad típusú adenovírus képes a szaporodásra, az E1A és E1B hiányos vírus nem.

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Alapítvány Biotechnológiai Intézetében az Orvosi Biotechnológiai és Remediációs Osztály (Baybio) 2003-ben az alábbi vizsgálatokat végezte:

1. Aszeptikus, a GM-CSF-t kódoló adeno-vektorvírusok nagyléptékben történő szaporítására alkalmas laboratóriumi részleget alakítottunk ki, ahol a vektorvírus készítmények nagy biztonsággal előállíthatók.
2. Kidolgoztuk a vektorvírus készítmények nagyléptékben történő előállításának technológiáját.
3. Ellenőriztük a Sugárbiológiai Intézetben Dr. Sáfrány munkacsoportja által előállított vektorvírus készítményekben a vírusok szaporítása alkalmával - esetleg back-mutációval fellépő - virulens Adeno virionok jelenlétét. Permissive (H-293 MS 2) és non-permissive (HEP-2) szövetkultúrák mikrotitrátor tenyészeteiben, párhuzamosan végzett titrálásokkal megállapítottuk, hogy a Sugárbiológiai Intézetben terápiás célra előállított vektorvírus preparátumokban a competens- virulens virionok tekintetében fellépő back-mutációk valószínűsége **$1/10^6 - 1/10^7$, vagy ennél kisebb.**
4. Megkezdtük egy, a back-mutációk valószínűségének ellenőrzésére nagyságrendekkel alkalmasabb (érzékenyebb), a permissive és non-permissivel szövetkultúra sejtek dehidrogenáz enzimrendszere aktivitásának mérésén alapuló módszer kidolgozását, mellyel a back-mutációk 100%-os biztonsággal kiszűrhetők.

2. Endotoxin jelenlétének kizárása

A vektor preparátumban kétszeresen ellenőrizzük az endotoxin esetleges jelenlétét. Mind az OSSKI-ban, mind pedig a BAYBIO-ban endotoxin ELISA-t alkalmaznak.

3. Mycoplasma jelenlétének kizárása

Az OSSKI-ban Mycoplasma Detection PCR kit-et (SIGMA) alkalmaznak. A BAYBIO indikátor sejteken végzett tenyésztés után Hoechst festékkel végzi a mycoplasma esetleges jelenlétének kimutatását.

4. Bakteriális kontamináció jelenlétének kizárása

Az OSSKI Környezeti Sugárbiológia Osztályán (felelős: Dr. Gázsó Lajos, ig.h.) különböző indikátor médiumokon végzik a tenyésztést.

5. Az emberi GM-CSF-et kódoló adenovírus alapú vektor minőségi paramétereinek végső, az előállítótól független ellenőrzése

Amennyiben a fenti vizsgálatok során a vektor a klinikai felhasználásra alkalmasnak minősül, a végső ellenőrzés a Johan Béla Országos Epidemiológiai Központ Virologiai Főosztályán (OEK-VF), Berencsi György, főosztályvezető főorvos vezetésével történik. A vektor csak akkor kerülhet klinikai felhasználásra, amennyiben itt is megfelel a minőségi paramétereknek.

9.D. Agydaganatos betegek vakcinálása GM-CSF-et termelő autológ daganatsejtekkel

A Fázis I klinikai protokoll végleges formája elkészült (**RP9.Melléklet**)

Az altémában 2003-ban más teljesítés nem történt. Dr. Timár József

9.D. alt. Kísérletes agydaganatok kezelése gyógyszer-érzékenyítő génekkel

Megkezdjük egy olyan génterápiás eljárás kidolgozását, amellyel megnövelhető a rosszindulatú daganatok kemoterápia iránti érzékenysége. A kemoterápiás szerek iránti érzékenyítés alapja az, hogy génszintézeti úton módosított daganatsejtekben olyan enzimek termelődnek, amelyek kemoterápiás szerek prekursoraiból aktív metabolitokat készítenek. Ezáltal a szisztémásan adott kemoterápiás gyógyszerek daganaton belüli lokális koncentrációja jelentősen megnő és fokozott terápiás hatás érhető el. Az eljárás segítségével elsősorban a primer daganat gyógyítható. A leggyakrabban használt gyógyszer-érzékenyítő eljárás a timidin kináz - ganciclovir rendszert alkalmazza. A ganciclovir önmagában nem toxikus emberi sejtekre. Az eljárás során a kezelendő sejtekbe beviszik a herpes simplex vírus timidin kináz (TK) génjét. A TK enzim foszforilálja a ganciclovirt és a keletkező metabolit gátolja a DNS polimerázokat. A gátlás hatására a TK gént tartalmazó sejtek elpusztulnak.

Egy másik potenciális gyógyszer-érzékenyítő gén az E. coli uracil-foszforibozil transzferáz (UPRT) enzimje. Az UPRT a daganat terápiában gyakran használt 5-fluorouracil (5-FU) fokozott metabolikus aktivációjában játszik szerepet.

9.D.alt.1. In vitro kísérletek

Megjegyzés: a beszámoló ezen része a korábbi beszámoló anyaga. Dr. Timár József

Eddigi vizsgálataink során kialakítottunk egy olyan adenovírus alapú vektorrendszert (CAUPTK), amely mind a TK, mind pedig az UPRT gént tartalmazza. Tanulmányoztuk, hogy a CAUPTK vektor glioma sejtekbe történő bevitele mennyiben fokozza a megfelelő gyógyszer kombináció iránti érzékenységet *in vitro* és *in vivo* körülmények között.

Elsőként a GI261 sejtek *in vitro* 5-FU és ganciclovir érzékenységét és ennek CAUPTK transzdukció hatására történő változását tanulmányoztuk. A ganciclovir önmagában nem toxikus a vírussal nem fertőzött sejtekre. A sejtek CAUPTK-val történő fertőzése után viszont már jelentős citotoxicitást észleltünk. Az 5-FU önmagában is csökkentette a sejt számot, mivel az eukarióta sejtek képesek a gyógyszert metabolizálni. Az 5-FU citotoxikus hatása azonban lényegesen fokozódott az UPRT gént kódoló vírus jelenlétében. A nem transzdukált GI261

sejtek kombinált kezelése 5-FU-val és ganciclovirral hasonló hatású volt, mint az 5-FU kezelés önmagában. Ezzel szemben az érzékenyítő génnel transzformált sejtek kombinált kezelésekor jelentősen nagyobb citotoxikus hatás volt észlelhető, mint az 5-FU vagy ganciclovir monoterápia esetében.

9.D.alt.2. Kombinált 5-FU/ganciclovir kezelés hatása kísérletes tumor modellen

Megjegyzés: a beszámoló ezen része a korábbi beszámoló anyaga. Dr. Timár József

A gyógyszer-érzékenyítő génterápia hatását szubkután és intrakraniális tumor modellen vizsgáltuk. Szubkután, ill. intrakraniális tumorokat hoztunk létre érzékenyítő géneket tartalmazó GI261 sejtek oltásával. A TK és az UPRT gének bejuttatásához GI261 sejteket fertőztünk CAUPTK-val 100 vírus/sejt arányban, két nappal a tumor transzplantáció előtt. A kontroll állatokat nem transzdukált GI261 sejtekkel oltottuk. A kontroll egerek tumor növekedésében nem volt lényeges különbség, hasonló ütemben nőttek a kezeletlen és az 5-FU-al vagy/és ganciclovirral kezelt állatok tumorai is. Ezzel szemben az érzékenyítő géneket tartalmazó 5-FU-al, ganciclovirral valamint mindkét gyógyszerrel kezelt állatok tumor növekedése lényegesen lassabb volt, illetve tumor ki sem alakult.

Hasonló eredmények voltak megfigyelhetők az agytumoros egereknél is. Valamennyi kontroll állat elpusztult 3-4 héttel a tumor transzplantáció után. Hasonlóan, az összes kezeletlen gyógyszer-érzékenyítő gént tartalmazó állat is elpusztult. Ezzel szemben az 5-FU-val kezelt, érzékenyítő géneket tartalmazó állatok 10-20%-a, a ganciclovirral kezelték 40-50%-a meggyógyult. Leghatékonyabbnak a kombinált kezelés bizonyult, ahol a túlélés elérte a 60-80%-ot, ami megerősítette az *in vitro* kísérletek eredményeit, miszerint legnagyobb citotoxikus hatása a kombinált kezelésnek van.

9.D.alt.3. A gyógyszer-érzékenyítő génekkel végzett génterápia kombinációja hagyományos terápiás modalitásokkal

Az új terápiás eljárásokat mindig a már meglévő modalitásokkal kell kombinálni. Tanulmányoztuk, hogy a gyógyszer-érzékenyítő génekkel végzett génterápia kombinálható-e sugárterápiával. Két kísérlet-sorozatot végeztünk. Az első sorozatban, egerekben agydaganatot indukáltunk gyógyszer-érzékenyítő géneket tartalmazó, illetve azt nem tartalmazó GI261 sejtek különböző arányú keverékével. Az agydaganatos állatokat a korábban leírtaknak megfelelően 5-FU/GC-vel, lokális sugárterápiával (4 Gy rtg sugárzás), illetve a kettő kombinációjával kezeltük. Kialakítottunk egy olyan kísérleti feltétel rendszert, amikor a gyógyszer-érzékenyítő génterápia önmagában nem eredményezte a daganatos állatok gyógyulását. A sugárterápiával az agydaganatos egerek mintegy 20%-ánál értük el a daganat teljes eltávolítását. Igen eredményes volt viszont a gyógyszer-érzékenyítő génterápia és a sugárterápia kombinációja. Amennyiben az összes daganatsejt tartalmazta az érzékenyítő géneket a túlélés 80-100% volt. Még abban az esetben is, amikor a daganatsejtek kevesebb, mint 10%-a tartalmazta az érzékenyítő géneket, a túlélés elérte a 40%-ot.

A másik kísérlet-sorozatban egerekben subcután daganatot indukáltunk gyógyszer-érzékenyítő géneket nem tartalmazó GI261 sejtek oltásával. Három nappal később a daganatba közvetlenül injekcióztuk a CAUPTK vektort. Ez után az állatokat 5-FU/GC és lokális besugárzás különböző kombinációjával kezeltük. A kombinált kezelés jelentős mértékben visszaszorította a daganat növekedését. Eredményeinket folyó-évben szakmai folyóiratban publikáltuk.

9. D. alt.4. A daganatsejtek immunogenitásának fokozása génterápiás eszközökkel

A daganat ellenes immunválaszban több tényező együttes hatása játszik szerepet. Az eredményes immunválasz kiváltásához a daganatsejtek felszínén jelen kell, hogy legyenek az immunprezentációért felelős makromolekulák (MHC-I, MHC-II, B7-1, B7-2, stb.), emellett

szükséges olyan immunsejtek jelenléte is, amelyek az antigén prezentációban játszanak szerepet (pl. dendritikus sejtek). Ebben a jelentési periódusban azt tanulmányoztuk, hogy fokozható-e a daganatellenes immunválasz, amennyiben a daganatsejtek felszínén növeljük az immunogenitásban szerepet játszó molekulák mennyiségét.

Először a B7-1 termelő glioma sejtekkel való vakcináció terápiás hatását vizsgáltuk. Egereket intrakraniálisan vad típusú glioma 261 sejtekkel transzplantáltunk. Ezzel párhuzamosan glioma 261 sejteket in vitro B7-1-t termelő adenovírusal fertőztük különböző vírus/sejt arányban. Ezután a sejteket besugaraztuk a sejtsztódás leállítására, majd 3 nappal az intrakraniális tumor indukciót követően az egereket a sejtekkel szubkután transzplantáltuk. Ha magas, 100, 200 vagy 300 vírus/sejt arányokat használtunk a fertőzés során, vagyis ha a vakcinációra használt glioma sejtek nagy mennyiségű B7-1 fehérjét termeltek, semmilyen terápiás hatást nem észleltünk. Ha a fertőzést 10 vírus/sejt arányban végeztük, az egerek 15 %-a meggyógyult. A kísérletet elvégeztük úgy is, hogy a gliomás egereket három alkalommal, 3 napos időközönként vakcináltuk 10 vírus/sejt arányban fertőzött glioma sejtekkel. A terápiás hatáson azonban a többszörös vakcináció nem javított. Következésképpen a B7-1-t termelő glioma sejt vakcinák terápiás hatása önmagában nem kielégítő, legalábbis akkor nem, ha a vakcinációt szubkután végeztük.

Egy másik kísérlet keretében egereket intrakraniálisan olyan életképes glioma sejtekkel transzplantáltunk, amelyeket előzőleg különböző vírus/sejt arányban B7-1-t kódoló adenovírusal fertőztünk. Ha a sejteket 300 vírus/sejt arányban fertőztük a vírussal, valamennyi egér elpusztult. 200, illetve 100 vírus/sejt arány esetében az egerek 10%-a meggyógyult. 10 vírus/sejt arány esetében az egerek 80%-a meggyógyult. Következésképpen, ha a sejtek kis mennyiségben termelték a B7-1 molekulát, jelentősebb hatást értünk el, mint akkor, ha a sejtek nagy mennyiségben termelték azt.

Jelenleg azt tanulmányozzuk, hogy a GM-CSF-et termelő sejtekkel végzett vakcináció terápiás hatását javítja-e az, ha a vakcina a GM-CSF mellett B7-1 molekulákat is termel.

In extenso közlemény

1. Désaknai, Sz., Lumniczky, K., Hidvégi, E.J., Hamada, H. and Sáfrány G. (2001) Brain tumor treatment with IL-2 and IL-12 producing autologous cancer cell vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 495. 369-372.
2. Lumniczky, K., Désaknai, Sz., Mangel, L., Szende, B., Hamada, H., Hidvégi, E.J., and Sáfrány G. (2002) Local tumor irradiation augments the anti-tumor effect of cytokine producing autologous cancer cell vaccines in a murine glioma model. *Cancer Gene Ther.* 9. 44-53.
3. Désaknai, Sz., Lumniczky, K., Esik, O., Hamada, H. and Sáfrány G. (2003) Local tumour irradiation enhances the anti-tumour effect of a double-suicide gene therapy system in a murine glioma model. *J Gene Med.* 5: 377-385.

Klinikai Protokoll

Fázis I klinikai protokoll agydaganatos betegek kezelésére, autológ, genetikai úton módosított, GM-CSF-et termelő glioma sejtekkel

A Fázis I klinikai protokoll irányítója:

Prof. Dr. Nyáry István, főigazgató-főorvos,
Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet
Feladat: az egész protokoll irányítása, különös tekintettel a klinikai eljárásra

A Fázis I klinikai protokoll társirányítói:

Dr. Sáfrány Géza, főosztályvezető-főorvos,
OKK - Országos Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet
Feladat: GM-CSF kódoló adenovírus vektor nagymennyiségű előállításának, genetikai úton módosított glioma sejtek kialakításának, in vitro immunológiai teszteknek az irányítása

Dr. Hídvégi Egon, főtanácsos,
Országos Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet

Prof. Dr. Pálóczi Katalin,
Országos Gyógyintézeti Központ
Feladat: klinikai immunológiai vizsgálatok irányítása

Dr. Mécs Imre,
Bay Zoltán Biotechnológiai Alapítvány
Feladat: Adenovírusalapú vektorok biztonsági vizsgálatának irányítása

Hamada Hirofumi, M.D., Ph.D., Dept. Head.,
Sapporo Medical University, Biomedical Research Center, Sapporo, Japan
Feladat: GM-CSF kódoló adenovírus vektorrendszer kialakításának irányítása

A Fázis I klinikai protokoll közvetlen résztvevői:

Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet

Dr. Sipos László, főorvos
Feladat: a glioblastomás betegek sugárkezelésének és chemoterápiájának Irányítása

Dr. Váradi Péter, adjunktus
Feladat: a klinikai beteganyag menedzselése, az OITI projekt koordinátora

Dr. Vitanovics Dusán

Feladat: adatgyűjtés és processzálás

Prof. Dr. Áfra Dénes

Feladat: diagnosztika (SPECT, PET)

Dr. Martos János, oszt. vez. főorvos

Feladat: diagnosztika (képalkotó módszerek, MRI, CT)

Dr. Várallyay Péter

Feladat: speciális képalkotó technikák (MRI)

Dr. Fedorcsák Imre, oszt. vez. főorvos

Feladat: a sugárterápia irányítása

Dr. Szeifert György, főorvos

Feladat: gamma és sugársebészet

Dr. Hegedűs Balázs, osztályvezető

Feladat: daganat-sejt tenyésztés, sejt kultúra technikák

Dr. Fazekas Ilona, főorvos

Feladat: daganat-sejt tenyésztés, sejt kultúra technikák

Dr. Hanzély Zoltán, oszt. vez. főorvos

Feladat: patológia

OKK - Országos Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet

Szatmári Tünde, vektor és genetikai úton módosított sejtek előállítása,

Dr. Lumniczky Katalin, in vitro immunológiai vizsgálatok

Országos Gyógyintézeti Központ

Bay Zoltán Biotechnológiai Alapítvány

Sapporo Medical University, Biomedical Research Center, Sapporo Japan

Uchida, M.D., Ph.D., adenovírus vektor kialakítása

A klinikai protokoll hazai tanácsadó testülete

Prof. Dr. Áfra Dénes

Prof. Dr. Eckhardt Sándor

A klinikai protokoll nemzetközi tanácsadó testülete

Dr. L. Salford, M.D., Ph.D., Head, Dept. Neurosurgery, Lund Univ., Lund, Svédország, génterápiás protokoll irányítója agydaganatok kezelésére IFN γ termelő autológ sejtekkel

A. Mackiewicz, M.D., Ph.D., Department of Cancer Immunology, University School of Medical Sciences, Poznan, Lengyelország, több mint 200 melanomás beteget kezelt IL-6 termelő allogenikus sejtekkel

Dr. G. Finocchiaro, M.D., Ph.D., Head, Istituto Nazionale Neurologico C. Besta, Laboratory of Neuro-Oncology and Gene Therapy, Milánó, Olaszország, több mint 20 agydaganatos beteget kezelt génterápiával

Független értékelő testület

Vezető: *Prof. Dr. Eckhardt Sándor*, akadémikus

Független betegjogi képviselő

Dr. Nagy Ferenc, jogász

A Klinikai Protokoll összefoglalása

A javasolt klinikai protokoll célja daganatellenes immunválasz kiváltása agytumoros betegekben. Az alkalmazandó eljárás során agydaganatos betegeket kívánunk kezelni, genetikai úton módosított, besugarazott, emberi GM-CSF-et termelő, autológ glioma sejt vakcinákkal.

A javasolt klinikai protokoll során először a betegből műtéti úton eltávolított daganatból primer sejt kultúrát indítunk. A sejt kultúrában növekvő daganatsejtekbe adenovírus alapú vektorrendszer segítségével emberi GM-CSF-et kódoló gént viszünk be. Két nappal később, a GM-CSF termelő daganatsejteket a sejtosztódás leállítására, a sejtek elpusztítása céljából 50 Gy ⁶⁰Co- γ -sugárzással besugarazzuk. A GM-CSF-et termelő sejteket intrakután oltással visszajuttatjuk ugyanabba a betegbe, akiből eredetileg daganatot eltávolítottuk. Az eljárástól azt várjuk, hogy a vakcinálás hatására az agydaganatos beteg immunrendszere specifikusan aktiválódik a daganat ellen és megtámadja, elpusztítja a primer daganat helyén visszamaradt daganatsejteket.

Az tervezett I. fázisú klinikai protokoll során tizenkét beteget kívánunk kezelni. Az eljárásba olyan glioblastoma multiformis betegeket kívánunk bevonni, akiből az agydaganat legalább 90%-át sikerült műtéti úton eltávolítani. A műtéti kezelést követően a betegek sugaras kezelésben részesülnek a hagyományos klinikai protokoll szerint. Ezt követően, adjuváns terápiaként a betegeket autológ, GM-CSF-et termelő daganatsejtekkel kezeljük az immunrendszer aktiválásának céljából. A kezelt betegekben nyomon követjük a klinikai tünetek alakulását, az immunrendszer aktiválódását, valamint a Magyarországon még nem alkalmazott génterápiás eljárás esetleges mellékhatásait.

1.0 Célkitűzések

A tervezett klinikai bevezetési eljárás hosszú távú célja egy immunterápiás eljárás kidolgozása malignus agydaganatok kezelésére. Első lépésként tizenkét glioblastoma multiforme beteget szeretnénk immunizálni genetikai úton módosított, emberi GM-CSF-et termelő, autológ daganatsejt vakcinákkal. A tervezett eljárás most publikált állatkísérletes eredményeinken alapszik. Megállapítottuk, hogy GM-CSF-et, IL-2-t, IL-4-et, vagy IL-12-t termelő autológ daganatsejtekkel való vakcinálás esetén az agydaganatos egerek 30-40% meggyógyul. A vakcináció eredményeként a kísérleti egér immunrendszere specifikusan aktiválódott a daganat ellen. A GM-CSF vakcinációs eljárás lokális sugárterápiával való kombinációja esetén 80-100%-os terápiás hatás is elérhető volt (1,2).

1.1 A tervezett eljárás egyik legfontosabb célja a humorális és a sejt immunrendszer aktivációjának nyomon követése agydaganatos betegekben, GM-CSF termelő, 50 Gy sugárdózissal besugarazott, autológ daganatsejtekkel való vakcinálás hatására.

1.2 Nyomon követjük az immunizáció hatását a tumor regressziójára, a betegség progressziójára, klinikai lefolyására nézve.

1.3 Több, mint kettőszázötven klinikai bevezetési eljárás folyik világszerte különböző daganatos megbetegedések kezelésére génterápiás eljárásokkal, különböző vírus vektorokat használva. Ezek az eljárások bizonyították, hogy a módszer biztonságos és hogy alig fordulnak elő mellékhatások. Ennek ellenére gondosan figyeljük az esetleges mellékhatásokat.

2.0 Tudományos előzmények, a klinikai protokollt alátámasztó szakmai háttér

A daganatos megbetegedések kialakulásához vezető molekuláris biológiai folyamatok jelentős részének megismerése sajnos nem vezetett el az agydaganatos betegek túlélési esélyeinek a javulásához. Emberben az intracraniális daganatok 30-45%-a sorolható a gliomák közé. A gliomák közül a glioblastoma multiforme a leggyakoribb. A lokálisan rendkívül agresszíven növekvő glioblastoma multiforme nagyon ritkán metasztatizál, mégis az esetek túlnyomó többségében halálos kimenetelű. A gliomák hagyományos kezelése általában sebészi beavatkozást követő sugár- és/vagy kemoterápiából áll. A kezelés ellenére a betegek többsége egy éven belül meghal, az ötéves túlélés esélye csak mintegy 5-6%. Ez a rendkívül alacsony túlélés szükségesszerűvé teszi gyökeresen új terápiás eljárások kidolgozását, a klinikai gyakorlatba való bevezetését. A tudomány mai fejlettsége szerint indokolt a génterápiás-immunterápiás kezelések klinikai kipróbálásának elkezdése.

2.1 Műtéti eljárások

A makroszkóposan minél teljesebb tumor-resectio érdekében kiterjesztett diagnosztikus vizsgálatokat végzünk a morfológiai és funkcionális eltérések minél pontosabb vizualizálására. Ehhez igénybe vesszük a legújabb fejlesztéseket az imaging területén (PET, speciális MRI vizsgálatok /21/). Ez utóbbi eljárás (ferumoxid, vírus-nagyságú vasoxid partikulákkal történő image-enhancement) alkalmas lehet a vírusvektor szöveti penetráció modellezésére. A műtétek során a szokásos mikroszkópos technika kiegészítésére intraoperatív eljárásokat is alkalmazunk (neuronavigáció, UH imaging), amelynek célja a minél radikálisabb tumor kiirtás.

2.2 Sugárterápia

A hagyományos (WBRT, szűkített mezős besugárzás) recidivák esetében kiegészülhet célzott pontbesugárzással is (jelenleg dedikált LINAC kezelés, 2003-tól gamma kés besugárzás).

2.3 Kemoterápia

A már bizonyított és elfogadott eljárások (nitrosourea, cisplatin) mellett más, újabb ágensek is szóba jöhetnek (temozolomide /22/).

2.4 Immunaktivációs, vakcinációs eljárások:

Irodalmi adatok szerint jelenleg több mint 250 klinikai bevezetési eljárás folyik daganatos megbetegedések génterápiás kezelésére. Ezen eljárások több mint fele a beteg immunrendszerét próbálja a daganat ellen aktiválni. Az immunrendszer aktiválására egy lehetséges módszer a citokin termelő daganatsejt vakcinák alkalmazása. A jelenleg folyó ilyen jellegű klinikai bevezetési eljárások (az összes daganat elleni génterápiás eljárások közel fele

ide tartozik) kétharmadával melanomás betegeket kezelnek. Így, például Gupta és munkatársai (3) retrovírus vektorral IL-2-t kódoló gént vittek be egy humán melanoma sejtvonalba. Ezzel az allogénikus (nem saját, más betegből származó) sejtvonallal vakcinálnak melanomás betegeket. Adataik szerint a mellékhatások jelentéktelenek és a betegek egy részében daganatellenes immunválaszt kaptak. Lengyel kollaborációs partnerünk. Prof. A. Mackiewicz (4, 5) *Fázis I-II* klinikai eljárás keretében eddig több mint kettőszáz melanoma malignus beteget vakcinált IL-6-ot termelő, allogénikus melanoma sejtek és a beteg saját daganatsejtjei keverékével. Eddig semmilyen jelentősebb mellékhatást nem észleltek. A betegek egy részében az immunrendszer aktivációját figyelték meg és a melanoma progressziója megállt. Eddigi eredményei alapján Prof. Mackiewicz *Fázis III* klinikai eljárás bevezetését tervezi (személyes közlés).

Jelenleg több klinikai bevezetési eljárás folyik agydaganatos betegek génterápiás-immunterápiás kezelésére. Sobol és munkatársai (6) egy glioblasztomás beteget vakcináltak IL-2-t termelő autológ fibroblasztok és a beteg saját glioma sejtjei keverékével. Jóllehet a súlyosan előrehaladott állapotban lévő beteg életét nem tudták a kezeléssel megmenti, de az immunrendszer glioma elleni aktivációjának a jelei kimutathatóak voltak. Mulder és munkatársai IL-2-t kódoló poxvírus vektort injekciónak közvetlenül a daganatba (7). Lotze és munkatársai IL-4-et kódoló retrovírus vektor segítségével *in vitro* körülmények között módosítják a betegből izolált glioma sejteket, majd az IL-4 termelő sejteket visszajuttatják a betegbe az immunrendszer aktivációja céljából. (8, 9). Ebből a munkacsoportból vált ki Okada, aki munkatársaival IL-4-et kódoló retrovírus vektor segítségével módosít, *ex vivo* körülmények között autológ glioma sejteket, majd ezzel vakcinálja a betegeket (10, 11). Yoshida és munkatársai IFN β közvetlen intratumorális injekcióját alkalmazzák glioblasztomás betegek kezelésére (12, 13). Eck és munkatársai (14) az Egyesült Államokban ezt az eljárást fejlesztik tovább. Egy adenovírus alapú vektor segítségével az IFN β gént közvetlen intratumorális injekcióval juttatják az agydaganatos betegbe. Black és munkatársai stabil sejt kultúrát készítettek három glioblastoma multiforme daganatból. A sejteket egymással és egy olyan fibroblast sejtvonallal keverik amely plazmid DNS-el való genetikai módosítás után GM-CSF-et termel. Fázis I klinikai bevezetési eljárás keretében ezzel a keverékkel vakcinálják agydaganatos betegeiket az immunrendszer aktiválása céljából (15).

A glioblasztomás betegek jelentős részében a TGF β szint megemelkedett és ez gátolja az immunrendszer daganatellenes aktiválódását. A glioma sejtek genetikai módosítása antisense TGF β RNS-el a glioma sejtek immunogenitásának fokozódását eredményezheti. Ezen alapul Fakhrai és Black (16) klinikai protokollja, amelyben a betegből eltávolított daganatsejteket módosítják TGF β antisense RNS-ekkel, és a módosított sejtekkel vakcinálják a betegeket. Hasonló elven alapszik egy, az elmúlt évben, Lengyelországban indított klinikai protokoll agydaganatos betegek kezelésére. A betegből származó glioma sejteket *in vitro* körülmények között IGF-1 antisense RNS-el kezelik és a módosított daganatsejteket adják vissza a betegnek (17).

Salford és munkatársai az általunk javasolt protokollhoz hasonlóan kezelik glioblasztomás betegeiket olyan autológ daganatsejtekkel, amelybe adenovírus vektor segítségével, *ex vivo* körülmények között visznek be interferon-gammát kódoló gént (18, 19).

Az említett eljárások igen értékes információkkal szolgálnak agydaganatos betegek citokin termelő vakcinákkal való kezelésére, de egyik sem azonos az általunk javasolt protokollal.

2.5 A Fázis I bevezetési eljárást alátámasztó saját adatok:

Az **OSSKI Molekuláris és Tumor Sugárbiológiai Osztályán** génterápiás-immunterápiás eljárást dolgoztak ki az immunrendszer agydaganatok elleni aktivációjára

citokin termelő, autológ daganatsejt-vakcinák alkalmazásával. Az eljárást egér glioma modell rendszerben alkalmazva glioma 261 daganatból sejt kultúrát készítettek, majd a sejt kultúrában növekvő sejtekbe adenovírus vektorokkal citokinek kódoló géneket vittek be. A citokin termelő sejteket a sejtosztódás leállítására ionizáló sugárzással besugárzták, majd a sejtekkel gliomás egereket vakcináltak. Megállapították, hogy IL-2-t, IL-4-et, IL-12-t és GM-CSF-et termelő, autológ daganatsejteket használva vakcinációra az állatok mintegy 20-50%-a meggyógyult. A vakcináció hatására citotoxikus T limfociták aktiválódtak a daganatsejtek ellen és immun-hisztokémiával kimutatható volt a daganat CD4+ és CD8+ sejt infiltrációja is. A vakcinációs eljárást lokális sugárterápiával kombinálva jelentős szinergista hatást figyeltek meg: az agytumoros állatok 70-100%-a meggyógyult. Eredményeik alapján úgy vélik, hogy a vakcinációs eljárás eredményesen használható agydaganatok adjuváns terápiájára (1,2).

Az **Országos Idegsebészeti Tudományos Intézet**-ben (OITI) kezelik a magyarországi agydaganatos betegek többségét. Az intézet ennek megfelelően rendkívül széleskörű tapasztalatokkal rendelkezik.

Az **Országos Gyógyintézet** Magyarországon talán a legalkalmasabb a betegekben kialakuló immunreakciók nyomon követésére.

A **Bay Zoltán Alapítvány** Biotechnológia Intézetének kutatói jelentős tapasztalattal bírnak különböző fertőző ágensek kimutatásában.

2.6 Alkalmazott sejt vonalak, vírus vektorok.

A klinikai bevezetési eljárás során minden beteget, a saját, genetikai úton, *ex vivo* körülmények között módosított daganatsejtjeivel kívánunk kezelni. A betegből műtéti úton eltávolított daganatsejtekből sejt kultúrát készítünk és a sejt kultúrában növekvő daganatsejtekbe adenovírus alapú vektor segítségével visszük be az emberi GM-CSF gén cDNS-ét. Az eljárás során a sejteket 10 vírus/sejt arányban kezeljük a vírus vektorral. A kezelést követően ELISA eljárással mérjük a sejtek GM-CSF termelését. Negyvennyolc órával a víruskezelést követően a sejteket 50 Gy Co- γ sugárdózissal besugárzzuk a sejtosztódás leállítása céljából. Ez a sugárdózis kellően magas ahhoz, hogy a sejtosztódást leállítsa és az összes sejtet egy héten belül elpusztítsa, de a sejtek GM-CSF termelése még 3-5 napig változatlan marad (1,2). A besugárzott, GM-CSF termelő sejtekkel intracután oltással ugyanazt a beteget vakcináljuk, akiből az eredeti tumort eltávolítottuk.

Az emberi GM-CSF gén bevitelére kétfajta adenovírus alapú vektorrendszert szeretnénk alkalmazni. Mindkét vektorrendszer közös jellemzője, hogy az adenovírus 5-ös típusán alapszik és, hogy a vírusvektor nem képes az emberi sejtekben való szaporodásra. A szaporodásra való képtelenséget azzal érjük el, hogy a vektorból eltávolítunk két olyan gént (E1A és E1B), amelyek fehérje terméke nélkülözhetetlen a vírusnak a sejtekben történő szaporodásához. Ez, a módosított vírus csak olyan sejtekben képes szaporodni, amelyek állandóan termelik az E1A és E1B fehérjéket. Ilyen, mesterségesen kialakított sejt vonal az emberi embrionális vese sejtéből kialakított, 293 jelű sejt vonal. Mindkét adenovírus alapú vektorrendszerből, emellett még hiányzik az E3 régió is, amely az adenovírus immunogenitásában játszik szerepet. Az egyik vírus vektorban a GM-CSF gén átírását a CMV promotor biztosítja. A másik vírusvektorban egy mesterséges promotor, a CAG található. A CAG a β -aktin gén promoterét és a CMV vírus fő, korai enhancerét tartalmazza. Ez a vektor emellett, egy mutációt is tartalmaz, az un. fiber régióban. Ez a régió a felelős a vírusfertőzés során a vírus sejtmembránhoz kapcsolódásáért, a fertőzés hatásosságáért. Ez a mutáció biztosítja, hogy a vírus fertőzés határfoka sokkal magasabb a glioblastoma multiforme sejtekben, mint normál sejtekben (20).

3.0 Az eljárásba bevonható betegek klinikai jellemzői

- 3.1 A malignus glioma diagnózisának szövettani megerősítése.
- 3.2 A daganatnak legalább 90%-át sikerült műtéti úton eltávolítani.
- 3.3 Az eltávolított daganatból sikerült sejt kultúrát kialakítani.
- 3.4 A beteg várható élettartama legalább három hónap
- 3.5 Jó haematológiai funkciók
- 3.6 Jó vese és májfunkció.
- 3.7 Alacsony adenovírus 5-ös típus elleni ellenanyag szint.
- 3.8 Nincs kemoterápiás háttér
- 3.9 A beteg írásos beleegyező nyilatkozata.
- 3.10 Húsz évet meghaladó életkor
- 3.11 Egyéb malignus megbetegedés kizárása
- 3.12 Legalább egy hét elteltével az esetleges szteroid kezeléstől.

4.0 A protokollba be nem vonható betegek jellemzői

- 4.1 Súlyos krónikus betegség (cardiovasculáris megbetegedések, angina pectoris, myocardialis infarktus)
- 4.2 Fertőző betegség jelenléte
- 4.3 Magas ellenanyag szint 5-ös típusú adenovírus ellen.
- 4.4 Terhesség, vagy szoptatás.
- 4.5 Autoimmun betegség fennállása.
- 4.6 Tartós szteroid kezelés.

5.0 Egyéb kezelési eljárásokhoz való viszony

Az alábbi terápiás eljárások nem alkalmazhatók a betegeknél a vakcinációs terápiával egyidejűleg: sugárterápia, kemoterápia, kortikoszteroid terápia (életmentő kezelés kivételével), egyéb az immunrendszert aktiváló kezelések

6.0 A beteg kezelés előtti értékelése

6.1 betegtörténet, fizikai vizsgálatok

6.2 Rutin vérvizsgálat

6.3 EKG

6.4 Koponya CT és/vagy MR vizsgálat a vakcinációs terápia megkezdése előtt három héten belül

6.5 5-ös típusú adenovírus elleni antitest vizsgálat

6.6 Vérminták immunológiai vizsgálatokra:

2x10 ml normál csőbe szérum vizsgálatra

2x10 ml heparinizált csőbe limfocita vizsgálatra

7.0 Immunizációs terv

7.1 A betegek egy nappal az immunizációs kezelés előtt felvételre kerülnek az Országos Idegsebészeti Tudományos Intézetbe, ahol a vakcinációs kezelést követő két napig maradnak megfigyelés céljából. További megfigyelésük járóbeteg rendelésen történik.

7.2 A betegek legalább négy vakcinációs kezelésben részesülnek. Az első három betegnél az immunizációt alacsony sejtszámmal kezdjük, míg a további betegeknél a sejtszámot növeljük.

Kezdeti dózis: 1×10^6 sejt intracután injekciója

Nagy dózis: a rendelkezésre álló sejtmennyiségtől függően a dózist 1×10^8 sejtszámig emeljük.

7.3 Fenntartó kezelés: a beteg állapotától függően háromhetes időközönként további három, összesen négy immunizációt tervezünk. Az immunizációt váltakozóan a felső végtagokon, a sejtek intracután oltásával végezzük. Amennyiben a vakcinált betegben kimutatható az immunrendszer aktiválódása a rendelkezésre álló sejtszám függvényében a vakcinációt tovább folytatjuk.

7.4 Az immunrendszer aktiválódásának nyomon követésére minden vakcinációs kezelés előtt vérmintát veszünk (ld. 8.0 pont).

7.5 A beteg immunizációs kezelésből való kivételének feltételei:

7.5.1 Súlyos, az immunizálás következtében kialakuló toxikus reakciók kialakulása esetén a kezelést azonnal leállítjuk.

7.5.2 Súlyos, az eredeti betegségtől független megbetegedés megjelenése.

7.6 Immunizálásra használt sejtek jellemzői: a műtéti kezelés során a betegből eltávolított gliomából *in vitro* sejt kultúrát készítünk. A vakcinálást minden esetben a beteg saját glioma sejtjeivel végezzük. A sejteket 40-48 órával a tervezett vakcináció előtt emberi GM-CSF-et kódoló adenovírus alapú vektorral 10 vírus/sejt arányban kezeljük. Az immunizációra használt sejteknek mentesnek kell lenniük endotoxintól, szaporodásra képes adenovírustól, mycoplasmától, baktériumoktól, gombáktól és más fertőzőképes ágensektől. A vizsgálatokat a Bay Zoltán biotechnológiai Alapítványnál végzik. A vakcináció előtt egy órán belül az *in vitro* növekvő sejteket 50 Gy Co- γ dózissal besugárzzuk. A besugárzás után a sejtek felülszójában ELISA reakcióval mérjük a GM-CSF szintet. A sejteket 0,5 %-os tripszin kezeléssel gyűjtjük be és fiziológias PBS oldattal háromszor mossuk, majd fiziológias PBS oldatban szuszpendáljuk, a sejtszámot meghatározzuk, a sejteket steril fecskendőben gyűjtjük. Az immunizáció minden esetben az Országos Idegsebészeti Tudományos Intézetben történik. Az immunizációt a klinikai bevezetési eljárás vezetője (Prof.Dr. Nyáry István, Főigazgató-főorvos) által kijelölt személy végzi.

8.0 A kezelés alatt végzett értékelés

8.1 Fizikai vizsgálat minden egyes immunizálás előtt.

8.2 Rutin vérvizsgálat minden egyes vakcinálás előtt.

8.3 Perifériális vérminták a celluláris és humorális immunaktiváció mérésére minden immunizálás előtt és két héttel a negyedik vakcináció után.

8.4 A primer agydaganat proliferációjának mérése CT és/vagy MR vizsgálattal két héttel a negyedik vakcináció után.

8.5 A vizsgálatból kikerült ún. "gyógyult" betegek kéthavonkénti nyomon követése fizikális vizsgálattal, esetenként CT és/vagy MR vizsgálattal.

9.0 Az immunrendszer aktivációjának nyomon követése

9.1 A humorális immunválasz nyomon követése:

Perifériális vérmintát veszünk minden betegből az immunizáció kezdete után 0, 2, 4, 6, 8, 12 héttel. A szérumot fagyaszttjuk, majd a glioma elleni antitestek kimutatására használjuk. A mérés során a szérumot a beteg *in vitro* tenyésztett glioma sejtjeivel hozzuk össze és standard immunofluoreszcenciás rendszerben mérjük a humorális immunrendszer tumor ellenes aktivációját.

9.2 A celluláris immunválasz mérése

9.2.1 A szisztémás immunválasz nyomon követésére az immunizáció kezdete után 0, 2, 4, 6, 8, 12 héttel perifériális vérmintát veszünk a betegből. A vérből mononukleáris sejteket izolálunk és *in vitro* citotoxicitás assay-vel vizsgáljuk a citotoxikus T limfociták (CTL) daganatsejtek elleni aktivációját.

9.2.2 Az MHC-I restricted CTL válasz vizsgálatára a citotoxicitás assay-t MHC-I elleni monoklonális antitestek jelenlétében is követjük. Amennyiben aktiválódott CTL választ nem tudunk kimutatni, úgy vizsgáljuk a CTL prekursorok jelenlétét.

9.2.3 Áramlási citometriával meghatározzuk a CD8+ és CD4+ limfociták mennyiségének alakulását a vérmintákban.

9.2.4 A betegből származó limfocitákból izolált mRNS kvantitatív reverz polimeráz láncreakciójával tanulmányozzuk a TH1 és TH2 sejtek aktiválódását.

9.2.5 Lokális immunaktiváció mérése a primer daganat körül. A lokális immunaktiváció nyomon követésére szelektált betegekből (ahol szisztémás immunválasz kimutatható) származó leukocitákat technéciummal jelöljük, majd a jelölt sejteket intravénás injekcióval visszajuttatjuk a betegbe. Szcintigráfiával vizsgáljuk a jelölt leukociták primer daganat körüli lokalizációját. A daganat ellenes immunaktivációban a CD4+ és CD8+ sejtek játszhatnak szerepet. A szcintigráfiás vizsgálat specifikusabbá tételére FACS analízissel CD4+ és CD8+ sejteket izolálunk a betegből. Az így nyert limfocita szubpopulációt jelöljük és juttatjuk vissza a betegbe.

9.2.6 A lokális immunválasz post mortem vizsgálata. A beteg elhalálása esetén a daganatos szövetben immunhisztokémiai reakciókkal vizsgáljuk a CD4+ és CD8+ sejtek jelenlétét.

10.0 A terápiás válasz értékelése

10.1 *Teljes válasz (TV)*: a daganat jelenlétének klinikai kimutathatatlansága fizikai vizsgálattal, CT és/vagy MR vizsgálattal legalább négy hetes időtartamra.

10.2 *Részleges válasz (RV)*: CT és/vagy MR vizsgálattal a daganat térfogata legalább 50 %-al csökken négy hetes időtartamra.

10.3 *Mérsékelt válasz (MV)*: 25-49% csökkenés a tumor térfogatban legalább négy hétig.

10.4 *Stabil betegség (SB)*: Kevesebb mint 25 % csökkenés a tumor térfogatban legalább négy hétig.

10.5 *Progreáló betegség (PB)*: A tumor térfogat több mint 50 %-os növekedése

11.0 Toxicitási kritériumok

A toxicitást az általánosan használt toxicitás kritériumoknak megfelelően értékeljük:

0 - nincs toxikus reakció.

1 - enyhe, múló tünetek, amelyek nem igényelnek kezelést és nem zavarják a napi tevékenységet.

2 - mérsékelt toxicitás

3 - komoly toxikus tünetek, amelyek zavarják a napi tevékenységet és orvosi beavatkozást, szükség szerint kórházi kezelést igényelnek.

4 - életveszélyes toxikus reakció, amely kórházi kezelést igényel

12.0 Kóros tapasztalatok

Irodalmi adatok szerint az allogénikus, vagy autológ (szingénikus) tumor sejtekkel végzett vakcinációk esetén csak minimális mellékhatásokat észleltek. A betegeknél általában enyhe gyulladás és erythema jelentkezik a vakcináció helyén. Az általunk javasolthoz hasonló vakcinációs kezelést követően eddig nem írtak le egyetlen anaphylaxiás sokkos esetet sem. Külön ki szeretnénk hangsúlyozni, hogy az általunk alkalmazott eljárás során nem injektálunk közvetlenül adenovírus alapú vektorokat a betegbe, hanem a vírusvektort a betegből származó daganat sejtek *ex vivo* kezelése során használjuk. Eddig egyetlen olyan esetet sem írtak le az irodalomban, hogy a vakcinációra használt daganatsejtek új lokalizációjú tumort indukáltak volna. Ismét ki szeretnénk emelni, hogy a sejteket felhasználás előtt 50 Gy egyszeri, akut sugárdózissal kezeljük. Ez a sugárdózis bizonyítottan leállítja a sejtosztódást és egy héten belül, az összes sejtet elpusztítja.

A kezelés alatt fellépő bármilyen súlyos mellékhatást azonnal jelentünk.

13.0 Az I. fázisú klinikai bevezetési eljárás értékelése

A tervezett eljárás során glioblastoma multiforme-s betegeket kívánunk kezelni autológ, GM-CSF-et termelő daganatsejt vakcinákkal. A betegeket a vakcinálás előtt a szokásos műtéti és sugárterápiával kezelik. A Fázis I eljárás célja az immunrendszer aktiválódásának a mérése és a vakcinációs kezelés hatására esetleg fellépő toxicitás kimutatása. Amennyiben mérsékelt toxicitás mellett az immunrendszer anti-tumorális aktivitása kimutatható, úgy az eljárást pozitívan értékeljük, és javaslatot teszünk a vizsgálatok kiterjesztésére az esetleges terápiás hatás mérése céljából.

Irodalom

1. Désaknai, Sz., Lumniczky, K., Hidvégi, E.J., Hamada, H. and Sáfrány G. (2001) Brain tumor treatment with IL-2 and IL-12 producing autologous cancer cell vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 495. 369-372.
2. Lumniczky, K., Désaknai, Sz., Mangel, L., Szende, B., Hamada, H., Hidvégi, E.J., and Sáfrány G. (2002) Local tumor irradiation augments the anti-tumor effect of cytokine producing autologous cancer cell vaccines in a murine glioma model. *Cancer Gene Ther.* 9. 44-53.
3. Gupta, TKD., Cohen, EP. and Richards, JM. (1997) Clinical protocol: Phase I evaluation of interleukin-2.transfected irradiated allogenic melanoma for the treatment of metastatic melanoma. *Human Gene Ther.* 8. 1701-1714.
4. Nawrocki S, Murawa P, Malicki J, Kapcinska M, Gryaska K, Izycki D, Kaczmarek A, Laciak M, Czapczyk A, Karczewska A, Rose-John S, Mackiewicz A. (2000) Genetically modified tumour vaccines (GMTV) in melanoma clinical trials. *Immunol Lett* 15. 81-86.
5. Mackiewicz A, Kapcinska M, Wiznerowicz M, Malicki J, Nawrocki S, Nowak J, Murawa P, Sibilska E, Kowalczyk D, Lange A, Hawley RC, Rose-John S. (1998) Immunogene therapy of human melanoma. Phase I/II clinical trial. *Adv Exp Med Biol.* 451. 557-60.
6. Sobol, RE., Fakhrai, H., Shawler, D., Gjerset, R., Dorigo, O., Carson, C., Khaleghi, T., Koziol, J., Shifan, TA and Royston, I. (1995) Interleukin-2 gene therapy in a patient with glioblastoma. *Gene Therapy*, 2. 164-167.
7. van Herpen CM. and De Mulder PH. (2000) Locoregional immunotherapy in cancer patients: review of clinical studies. *Ann Oncol* 11. 1229-39.
8. Okada H, Attanucci J, Tahara H, Pollack IF, Bozik ME, Chambers WH, Lotze MT. Characterization and transduction of a retroviral vector encoding human interleukin-4 and herpes simplex virus-thymidine kinase for glioma tumor vaccine therapy. (2000) *Cancer Gene Ther* 7. 486-94.
9. Okada H, Pollack IF, Lotze MT, Lunsford LD, Kondziolka D, Lieberman F, Schiff D, Attanucci J, Edington H, Chambers W, Robbins P, Baar J, Kinzler D, Whiteside T, Elder E. (2000) Gene therapy of malignant gliomas: a phase I study of IL-4-HSV-TK gene-modified autologous tumor to elicit an immune response. *Human Gene Ther* 11. 637-53
10. Okada H, Giezeman-Smits KM, Tahara H, et al. (1999) Effective cytokine gene therapy against an intracranial glioma using a retrovirally transduced IL-4 plus HSVtk tumor vaccine. *Gene Ther.*;6:219-226.
11. Okada H, Pollack IF, Lieberman F, Lunsford LD, Kondziolka D, Schiff D, Attanucci J, Edington H, Chambers W, Kalinski P, Kinzler D, Whiteside T, Elder E, Potter D. (2001) Gene therapy of malignant gliomas: a pilot study of vaccination with irradiated autologous glioma and dendritic cells admixed with IL-4 transduced fibroblasts to elicit an immune response. *Human Gene Ther* 12. 575-95.

12. Wakabayashi T, Mizuno M. and Yoshida J. (1998) Gene therapy of central nervous system tumors. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 38. 763-71.
13. Hatano N, Wakabayashi T, Kajita Y, Mizuno M, Ohno T, Nakayashiki N, Takemura A, Yoshida J. (2000) Efficacy of post operative adjuvant therapy with human interferon beta, MCNU and radiation (IMR) for malignant glioma: comparison among three protocols. *Acta Neurochir (Wien)* 142. 633-8.
14. Eck SL, Alavi JB, Judy K, Phillips P, Alavi A, Hackney D, Cross P, Hughes J, Gao G, Wilson JM, Propert K. (2001) Treatment of recurrent or progressive malignant glioma with a recombinant adenovirus expressing human interferon-beta (H5.010CMVhIFN-beta): a phase I trial. *Human Gene Ther* 12. 97-113.
15. Zeltzer PM, Moilanen B, Yu JS, Black KL. (1999) Immunotherapy of malignant brain tumors in children and adults: from theoretical principles to clinical application. *Childs Nerv Syst.* 15. 514-28.
16. Liao LM, Fakhrai H, Black KL. (1998) Prolonged survival of rats with intracranial C6 gliomas by treatment with TGF-beta antisense gene. *Neurol Res.* 20. 742-7.
17. Kasprzak, H. (2001) IGF-1 (Insulin like growth factor 1) cellular therapy of brain tumors. (személyes közlés)
18. Visse E, Siesjo P, Widegren B, Sjogren HO. (1999) Regression of intracerebral rat glioma isografts by therapeutic subcutaneous immunization with interferon-gamma, interleukin-7, or B7-1-transfected tumor cells. *Cancer Gene Ther.* 6. 37-44.
19. Salford, LG., Siesjo, P., Skagerberg, G., Persson BRR., Kjellman C., Lindvall M., Visse, E. and Videgren B. (2001) Clinical immunisation with autologous glioma cells transduced with interferon-gamma by adenovirus. *Proc. Int.Symp. New Treatments for Brain Tumors: Gene Therapy and Neural Stem Cells.* pp.72-73. October 17-20. Parma, Italy,
20. Nakamura, T., Sato, K. and Hamada, H. (2002) Effective gene transfer to human melanomas via integrin targeted adenoviral vectors. *Human Gene Ther.* 13. 613-626.
21. Varallyay P, Nesbit G, Muldoon LL, Nixon RR, Delashaw J, Cogen JI, Pettillo A, Rink D, and Neuwelt EA: Comparison of two superparamagnetic viral-sized iron oxide particles ferumoxides and Ferumoxtran-10 with Gadolinium-chelate in imaging intracranial tumors *AJNR Am J Neuroradiol* 23:510-519, 2002
22. Sipos L, Vitanovics D, Áfra D: Recidiv malignus gliomák kezelése temozolomide-dal. *OH* 21:1201-1204, 2002
23. Vitanovics D, Áfra D: Glioblastoma multiforme: 1478 operált beteg klinikai és diagnosztikai adatai. *Clin Neurosci/Idegyógyászati Szemle* 51:236-242, 1998
24. Áfra D, Vitanovics D: Glioblastoma II. A műtéti és a posztoperatív kezelés eredményei. *Clin Neurosci/Idegyógyászati Szemle* 52:5-10, 1999