

行政院衛生署「基因醫藥衛生科技」整合型計劃

成果報告

計劃名稱：利用攜帶有第一型皰疹病毒胸腺酵素的重組腺病毒及攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒進行惡性腦瘤之基因治療 (Gene therapy of brain tumor by herpes simplex virus type I thymidine kinase gene delivered by adenovirus and angiostatin gene delivered by adeno-associated virus)

計劃編號：DOH 88-TD-1118C

執行期限：87- 7- 1 to 88- 7- 1

全程期限：87- 7- 1 to 90- 6-30

執行機構：國防醫學院、三軍總醫院 神經外科

主持人：林欣榮

職稱：國防醫學院外科教授、三軍總醫院 神經外科主任

聯絡電話：02-23670799

聯絡人：陳燕芬小姐

傳真：02-23670799

電子信箱：tsghns01@ndmctsgh.edu.tw

填表日期：1999- 5-25

## 目 錄

	頁 數
封面	( 001)
目 錄	(002-007)
一. 摘要	(008-009)
二. 計劃緣由與原訂年度目標	(010-041)
1. 自殺基因(suicide genes) 基因療法	
背景	
1. 惡性腦瘤之基因治療	
2. 自殺基因 (suicide genes) 療法	
實驗設計及方法	
1. 人類多形性神經膠質瘤細胞株及細胞培養	
2. 重組腺病毒的生產	
3. 人類多形性神經膠質瘤細胞株生長速率	
4. 重組腺病毒轉導效率	
5. 攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺毒以及 ganciclovir 進行基因治療之癌細胞殺死效率	
6. 裸鼠動物模式的產生及攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶 激酶的重組腺病毒的轉導作用	
7. 在在三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株細胞培養中 觀察旁觀效應(bystander effect)	
2. 抑制血管內皮新生(antiangiogenesis)的基因療法	
背景	
1. 抑制血管內皮新生的特殊基因療法	
2. 採用基因治療的方法來進行抑制腫瘤內血管新生治療策略的特殊目的	
3. 腺相關病毒(adeno-associated virus; AAV)	

## 實驗設計及方法

1. 建立可以生成鼠 angiostatin 的 cDNA 及 mAngiotatin-HA/pGEM-T
  2. 建立 mAngiostatin-HA/pCEP4
  3. 建立可以生成鼠 angiostatin 的 cDNA 及 mAngisotatin-HA-N/pGEM-T
  4. 建立 mAngiostatin-HA-N/pXX
  5. 建立基因重組帶有 mAngiostatin-HA 的細胞株
  6. 生產攜帶有 mAngiostatin-HA 的重組腺相關病毒
  7. 偵測 mAngiostatin-HA 的表現
  8. 臍靜脈內皮細胞的初培養(primary culture)
  9. 以臍靜脈內皮細胞(UVEC)的增生速率來測試 mAngiostatin-HA 的生物活性
  10. 基因重組帶有 mAngiostatin-HA 細胞株在 C6-Wistar rat 動物模式的生物效應
  11. 以攜帶有 mAngiostatin-HA 的重組腺相關病毒對 Wistar rat 中的 C6 惡性腦瘤進行基因治療
3. 合併療法(combined therapy)

## 實驗設計及方法

1. 在體內(in vivo)及體外(in vitro)測試重組腺相關病毒之轉導效率

## 三. 結果與討論

(042-116)

### 自殺基因(suicide genes) 基因療法初步成果

1. 三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株生長速率
2. 攜帶有 lacZ 報告基因的重組腺病毒對三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株轉導效率
3. 攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒以及 ganciclovir 治療對三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株進行基因治療之癌細胞殺死效率

#### 4. 攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重组腺病毒以及

ganciclovir 治療對三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株在裸鼠動物模式中腫瘤生長的效果

#### 5. 在三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株細胞培養中觀察旁觀效應

抑制血管內皮新生(antiangiogenesis)的基因療法初步成果

##### 1. 以基因工程的方法建立會分泌 angiostatin 的細胞株

(1)基因建構及表現

(2)抑制原發性腫瘤生長的效應

##### 2. 建立攜帶有 mAngiostatin-HA 的重组腺相關病毒

(1)基因建構及表現

(2)抑制原發性腫瘤生長的效應

合併療法(combined therapy)初步成果

##### 1. 攜帶有 lacZ 報告基因的重組腺病毒，重組腺相關病毒及合併使

用攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒在體內

(in vivo)及體外(in vitro)對不同細胞株之轉導效率

### 圖表及說明

自殺基因(suicide genes) 基因療法

(實驗設計及方法)

01. Nude rat & operation picture.

02. Protocol for operation and GCV treatment.

03. Spy therapy

04. Tk/pCEP4.

(初步成果)

05. Growth curve of GBM8401, GBM8804, and GBM8909 cell lines.

06. Transduction efficiency of AdCMVLacZ

07. Therapeutic effect of AdRSVtk in high cellular

density.

08. Therapeutic effect of AdRSVtk in low cellular density.
09. Tumor size between treatment and non-treatment group.
10. Tumor shrinkage percentage.
11. Transduction efficiency in tissue by AdCMVLacZ and apoptosis.
12. Bystander effect: GBM8401/tk to GBM8401 .
13. Bystander effect: GBM8401/tk to GBM8909.
14. Bystander effect: GBM8909/tk to GBM8401.
15. Bystander effect: GBM8909/tk to GBM8909.

#### 抑制血管內皮新生的基因療法

##### (實驗設計及方法)

16. Angiostatin & plasminogen cartoon figure.
17. Genetically-modified cell-targeted antiangiogenic gene therapy strategy.
18. Gene structure of mAngiostatin-HA/pCEP4.
19. AAV-targeted antiangiogenic gene therapy strategy.
20. Gene structure of pXX-mAngiostatin-HA.
21. Methods for the generation of recombinant AAV vector.
22. Gene structure of pXX-2 and pXX-6.
23. Human umbilical cord & UVEC
24. Protocol for the inhibitory effect of AAV-mAngiostatin-HA.
25. Protocol for the shrinkage effect of AAV-mAngiostatin-HA.

##### (初步成果)

26. PCR result: mAngiostatin-HA.
27. mAngiostatin-HA/pGEM-T

28. mAngiostatin/pCEP4.
29. IP for angiostatin in C6/mAngiostatin-HA/pCEP4
30. Growth curve of C6, C6/pCEP4, C6/mAngiostatin-HA/pCEP4.
31. Inhibition of HUVC proliferation by conditioned medium which containing angiostatin.
32. Tumor size: C6/pCEP4 : C6/mAngiostatin-HA/pCEP4.
33. H&E stain for Tumor size: C6/pCEP4 : C6/mAngiostatin-HA/pCEP4.
34. PCR results: mAngiostatin-HA-N.
35. mAngiostatin-HA-N/pGEM-T.
36. pXX-mAngiostatin-HA.
37. IP for angiostatin in C6 + AAV-mAngiostatin-HA.
38. Slot blot assay for titer of AAV-mAngiostatin-HA.
39. Inhibition of HUVC proliferation by AAV-mAngiostatin-HA.
40. Tumor size in inhibitory effect group (1).
41. Tumor size in inhibitory effect group (2).
42. Tumor size in shrinkage effect group (1).
43. Tumor size in shrinkage effect group (2).
44. Angiostatin effect in tumor.

#### 合併療法

(初步成果)

45. X-gal staining among different cell lines (GBM8401, GBM8909, C6, 293, HUVE cells) with AdCMVLacZ alone, AAVLacZ alone, and AdRSVtk +

AAVLacZ in vitro (1)

46. X-gal staining among different cell lines  
(GBM8401, GBM8909, C6, 293, HUVE cells) with  
AdCMVLacZ alone, AAVLacZ alone, and AdRSVtk +  
AAVLacZ in vitro (2)

47. X-gal staining in C6 glioma (wistar rat) with  
AdRSVtk + AAVLacZ

圖片

四. 計劃成果自評

(117-121)

五. 參考文獻

(122-143)

## 一. 摘要

人類的多形性神經膠質瘤是極端惡性的腦瘤，而且也是高度血管密佈的實質腫瘤(solid tumor)之一，其中包含有各式各樣不同表現型的惡性星狀細胞；雖然在影像診斷、手術技巧、及各種治療方法的努力下，近 20 年來，平均存活率仍是只有 12-18 個月左右(Black P.M., 1991)。不同的多形性神經膠質瘤細胞株，對於以重組腺病毒為載體的基因治療有不同的效果；為了探討這個現象，我們利用了三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株，將其應用在「裸鼠的動物模式」中，再使用重組腺病毒為載體，攜帶不同的基因來進行研究。我們發現這三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株的生長速率和不同的重組腺病毒載體感染率有相當的差異；但在裸鼠腦瘤動物模式中，三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株，卻有相近似的治療效果。在以基因工程修改過「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶基因」的人類多形性神經膠質瘤細胞株與野生型人類多形性神經膠質瘤細胞株共同培養的實驗中，我們發現藉由旁觀效應(bystander effect)的細胞毒殺作用，可以把具有較低重組腺病毒載體感染率的多形性神經膠質瘤細胞株有效的根除。

在裸鼠腦內以重組腺病毒載體為工具，攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶基因(Type I Herpes simplex virus-thymidine kinase; HSV-tk)，再施以 ganciclovir (GCV)治療，可以達到 80-91 %的顯著腫瘤縮小效應，但所有的實驗動物(裸鼠)中並沒有辦達到百分之百的治療效果，所以為要達到完整的治療效果，最好的方式是利用合併療法，比如抑制血管新生基因治療，加上免疫基因治療、或抑制血管新生基因的治療加上自殺基因治療。

Angiostatin 已被發現除了可以抑制原發性腫瘤生長外，並可以減少遠端轉移的程度。目前我們已生產完成攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒，其效價已高

於  $1 \times 10^{11}$  viral particles/ml，並測試在人類惡性腦瘤—裸鼠動物模式中的效能。以 C6 惡性腦瘤在 Wistar rat 的動物模式中，我們發現惡性腦瘤的生長受到相當的抑制。

整個研究計劃的最終目標是結合以上二種基因治療策略：1)使用攜帶第一型皰疹病毒胸腺醇素的重組腺病毒合併 ganciclovir 來殺死生長分裂迅速的惡性腦瘤(多形性神經膠質瘤)；2)使用攜帶 angiostatin 的重組腺相關病毒來對付殘存的、無法以手術切除乾淨的、生長慢的、甚至生長停滯不再分裂的惡性腦瘤細胞。我們預期這二種策略具有相乘效果，可以導致完全根除惡性腦瘤的目標。

## 二. 計劃緣由與原訂年度目標

這項研究的主要目標是研究以基因治療的方式對惡性腦瘤加以治療，主要計劃結合了三個策略：

(1)自殺基因策略：製造攜帶有第一型皰疹病毒之胸腺酵素基因的重組腺病毒，植入惡性腦瘤內達到治療的目的。實驗的目標如下：

1. 人類多形性神經膠質瘤細胞株細胞培養。
2. 重組腺病毒的生產。
3. 人類多形性神經膠質瘤細胞株生長速率。
4. 重組腺病毒轉導效率。
5. 攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒以及 ganciclovir 進行基因治療之癌細胞殺死效率。
6. 裸鼠動物模式的產生及攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒的轉導作用。
7. 在三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株細胞培養中觀察旁觀效應 (bystander effect)。

(2)抗血管新生策略：製造攜帶有 angiostatin (一種血管新生抑制劑) 的重組腺相關病毒，植入惡性腦瘤內達到治療的目的。實驗的目標如下：

1. 建立可以生成鼠 angiostatin 的 cDNA 及 mAngiostatin-HA/pGEM-T。
2. 建立 mAngiostatin-HA/pCEP4。
3. 建立可以生成鼠 angiostatin 的 cDNA 及 mAngiostatin-HA-N/pGEM-T。
4. 建立 mAngiostatin-HA-N/pXX。
5. 建立基因重組帶有 mAngiostatin-HA 的細胞株。

6. 生產攜帶有 mAngiostatin-HA 的重組腺相關病毒。
7. 偵測 mAngiostatin-HA 的表現。
8. 臍靜脈內皮細胞的初培養(primary culture)。
9. 以臍靜脈內皮細胞的增生速率來測試 mAngiostatin -HA 的生物活性。
10. 基因重組帶有 mAngiostatin-HA 細胞株在 C6-Wistar rat 動物模式的生物效應。
11. 以攜帶有 mAngiostatin-HA 的重組腺相關病毒對 Wistar rat 中的 C6 惡性腦瘤進行基因治療。

(3)合併療法：抑制血管新生基因的治療加上自殺基因治療；將攜帶有第一型皰疹病毒之胸腺酵素基因的重組腺病毒及攜帶有 angiostatin (一種血管新生抑制劑)的重組腺相關病毒，植入惡性腦瘤內達到治療的目的。實驗的目標如下：

1. 在體內(in vivo)及體外(in vitro)測試重組腺相關病毒之轉導效率。

## 自殺基因策略

### 背景

惡性腦瘤之基因治療：

多形性神經膠質瘤是極端惡性的腦瘤，佔了所有原發性腦瘤的百分之二十，而且是所有神經膠質瘤中最惡性的一型，它是由具有極端分歧且多樣化表現型的星狀細胞所增生而成，包含有不正常的有絲分裂、過度細胞增生、具有高度惡化的癌細胞且其邊緣出現壞死區域 (Cotran et al., 1994)。惡性腦瘤不易轉移、但容易局部復發，傳統的治療方式極為令人沮喪，一旦病患被診斷為惡性腦瘤，幾乎是等於宣判死刑，因為病患即使接受最現代化醫學的治療，包括神經外科開顱手術加以廣泛地切除惡性腦瘤、手術後的腦組織放射線治療、甚至再加上全身性的抗癌化學藥物治療，自診斷確定起，平均存活率仍是只有 12-18 個月左右(Black P.M., 1991; Mahaley et al., 1989; Walker et al., 1980)；主要的死亡原因並非像一般癌症一

樣的全身轉移，而是局部性腦瘤的復發，復發的部位也大都發生於切除腦瘤邊緣的二、三公分內。為何已做了廣泛性的惡性腦瘤切除後，腦瘤還會再復發呢？主要的原因是惡性腦瘤細胞不但分化快，而且很容易侵入正常的腦組織內生長，就像榕樹的根一樣，四面八方地到處鑽，雖然手術時把整顆榕樹拔除，但時常還會殘存一些細根在腦組織內，很快的根又長出大榕樹來，病人就又有腦瘤復發，以致死亡。所以全世界的相關學者都在攪盡腦汁尋找一個嶄新又具有突破性的療法。

由於要矯正癌細胞基因回復到完全正常的細胞並不容易，相對的，如何讓癌細胞自動死亡，技術上則較單純，因此就有自殺基因 (suicide genes)療法(Mastrangelo et al., 1996)，及利用抑制血管內皮新生的特殊基因的功能，使腫瘤生長受到抑制。

### 自殺基因 (suicide genes) 療法

應用的原理即是把能轉化藥物的特種酵素基因送入癌細胞內，使癌細胞內大量製造此種酵素，並在細胞內將無毒藥物轉化成有毒代謝物，癌細胞便被毒死。

目前最常用的自殺基因酵素系統是攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酵素基因「Type I herpes simplex virus-thymidine kinase (HSV-tk)」及 ganciclovir (GCV)(Moolten et al., 1986; Freeman et al., 1996)。Ganciclovir 是 2-deoxyguanosine 之合成的核甘類似物，為一種臨床病患最常用之抗病毒(如皰疹病毒或巨細胞病毒)藥物，其結構非常類似 DNA 的 guanine。該基因一旦送入癌細胞內，癌細胞便可大量製造 thymidine kinase 酵素，會把 ganciclovir 轉換成 phosphorylated ganciclovir，(由 monophosphate 變成 bi-phosphate，再利用細胞內原有的酵素系統將 biphosphate 變成 triphosphate)。而 ganciclovir-triphosphate 可以由兩已知的模式來抑制癌細胞 DNA 的合成：

- (一)競爭性抑制癌細胞 DNA polymerase 的活性。
- (二)直接併入癌細胞的 DNA；因此癌細胞的 DNA 信息就會產生錯亂而造成癌細胞 DNA 延長的停止，使癌細胞很快死亡 (Heyman et al., 1989)。

因此 HSV-tk 便被稱為自殺基因。並不是只有攜帶了第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激

酵素的細胞才會被殺死，其鄰近地區的未攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酵素的細胞也會被殺死；這個現象就叫做旁觀效應(bystander effect) (Culver et al., 1992; Freeman et al., 1993)。

把 HSV-tk 基因送入惡性腦瘤之方法很多，目前最常用的方法有兩種：

第一種是利用反轉錄病毒(retrovirus)當載體，亦即把 HSV-tk 基因接到一小段的反轉錄病毒基因上，然後送至特殊的包裝細胞株中；此特殊包裝細胞株的條件培養液(conditioned medium)中，就含有了攜帶有 HSV-tk 基因的反轉錄病毒載體(retroviral vector)。反轉錄病毒會感染分裂的細胞，並把 HSV-tk 基因輸送入分裂細胞的染色體內，使細胞內含大量 thymidine kinase 酵素，由於正常腦組織細胞很少分裂，因此正常腦神經細胞便很少被感染；相對的，惡性腦瘤細胞分裂較多、較快，被感染的比例就較高。利用大白鼠(Wistar rat)惡性腦瘤細胞(C6 glioma)種入大白鼠大腦的惡性腦瘤研究中，把帶有 HSV-tk 基因的反轉錄病毒注射入大白鼠惡性腦瘤細胞內，的確可讓 C6 glioma 消失。美國於 1992 年曾進行此項人體試驗計劃，以治療復發性惡性腦瘤病患，結果是有些療效，但並無法治癒病患；主要的原因是反轉錄病毒對人類的惡性腦瘤細胞感染率較大白鼠的 C6 glioma 低，而反轉錄病毒(retrovirus)只能感染部分的人類惡性腦瘤細胞。

第二種是利用「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酵素的重組腺病毒載體」傳送基因到細胞中。首先先直接注射此種重組腺病毒到人類腦瘤的裸鼠動物模式中，再由腹腔注射 ganciclovir 而產生效果，延長裸鼠動物模式的存活時間 (Boviatsis et al., 1994; Chen et al., 1994; Perez-Cruet et al., 1994)。利用「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酵素的重組腺病毒載體」傳送基因到腦中並不會造成死亡或殘障，而對神經細胞的毒性也在可接受的範圍之內(Shine et al., 1997; Goodman et al., 1996)。

以上的實驗也提供了臨床人體試驗的基礎 (Grossman et al., 1997; Lieberman et al., 1997; Eck et al., 1996)，大部分有關於這方面的研究是使用 9L gliosarcoma 或 C6 glioma 細胞株 (Maron et al., 1996; Barba et al., 1993; Perez-Cruet et al.,

1994; Namba et al., 1996); 但在人類以及啮齒類動物惡性腦瘤細胞間存在有潛在差異的情況下，自殺基因策略是否能完全適用於人類惡性腦瘤細胞，值得探討。有學者報告大部分的人類惡性腦瘤細胞對於自殺基因策略敏感性很好 (Sturtz et al., 1997)，但至今還沒有學者提出以「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒載體」傳送自殺基因到人類惡性腦瘤中究竟效果如何？而各式各樣不同表現型的人類多形性神經膠質瘤內部不同的細胞組成，在接受「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒」及 ganciclovir 治療時，其個別的反應如何？為了獲得這些在利用以重組腺病毒為載體的基因治療上所必要的資訊，我們利用了三株在臺灣所建立的人類惡性腦瘤(多形性神經膠質瘤)細胞株(GBM8401、GBM8804、及GBM8909)(Lee et al., 1988)來進行研究。首先先測定它們的生長速率、重組腺病毒轉導效率、及在體外(三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株細胞培養)或體內(裸鼠腦瘤動物模式)「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒」和 ganciclovir 進行基因治療時之癌細胞殺死效率。

我們的結果顯示這三株多形性神經膠質瘤細胞株其生長速率不同，對重組腺病毒的轉導效率也不同，但對「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒」以及 ganciclovir 進行基因治療時之癌細胞殺死效率卻相似。這表示包含有各式各樣不同表現型的多形性神經膠質瘤以「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒」以及 ganciclovir 進行基因治療是很有潛力的。

### 實驗設計及方法

人類多形性神經膠質瘤細胞株及組織培養：

人類多形性神經膠質瘤細胞株 GBM8401 是由一位三十一歲的臺灣女性的惡性腦瘤所分離純化培養出來的 (Lee et al., 1988)，GBM8804 及 GBM8909 也是以同樣的方法，由不同的臺灣惡性腦瘤病患所分離純化培養出來的 (Lee et al., 1988)。細

胞株是以 Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM; GIBCO-BRL, Co. Grand Island, NY), 再加入預先以 56°C, 30 分鐘處理過的 10%胎牛血清, 100IU/mL 的 potassium penicillin G 及 100mg/mL 的 streptomycin, l-glutamine 的 290 mg/L, 並放入內含 5 % CO<sub>2</sub> 的 37°C 潮濕培養箱中培養。

#### 重組腺病毒的生產:

我們進行本實驗用之重組腺病毒(包括 AdRSVtk 及 AdCMVlacZ)是由賓州大學的 Wilson 教授及 Albelda 教授所提供(Smythe et al., 1994; Smythe et al., 1994; Engelhardt et al., 1993), 包裝細胞株(293 細胞)是購自美國細胞株公司(ATCC, Rackville, MD, USA)以確保品質, 而擴充及濃縮後之病毒再以溶細胞斑分析法(Plaque lysis assay)來測定(Smythe et al., 1994; Smythe et al., 1994; Smythe et al., 1995; Berkner KL., 1988)。為了生產可傳送基因的重組腺病毒載體, 先將重組腺病毒質體和輔助性腺病毒 DNA 共同轉染病毒包裝細胞(293 細胞), 重組腺病毒產生後, 再挑獨株(single colony)大量培養, 然後用於感染細胞株及注射到動物體內, 並測試其傳送 DNA 至細胞內的能力。

#### 人類多形性神經膠質瘤細胞株生長速率:

在 10 公分培養皿中分別置放三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株(GBM8401, GBM8804, 及 GBM8909)  $1 \times 10^4$  個再分別培養 2、4、6、8、10 天, 以 trypsin 分離, 再計算細胞數目, 繪製生長速率圖。

#### 重組腺病毒轉導效率:

以攜帶有 lacZ 基因的重組腺病毒對三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株(GBM8401、GBM8804、及 GBM8909), 在 moi 為 0、10、50、100、500、及 1000 的情況下進行轉染。實驗方法為在六個小培養皿的大培養皿(6-well-plate)中每個小培養皿放入  $1 \times 10^5$  個細胞, 24 小時待其平貼生長良好後, 加入 0、10、50、100、500、及 1000 moi 的「攜帶有 lacZ 報告基因的重組腺病毒」, 36 小時後以  $1 \times$  PBS

沖洗後固定於 0.4 % formaldehyde (Medical Industries, Inc, Richmond, IL, USA) 及 0.2 % glutaraldehyde (Syma, Se Louis, MO, USA)) 中，並加入 X-gal solution (5 mM Potassium 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside 之 PBS 溶液中) 37°C 暖房培養 4 小時後，計算呈藍色細胞的數目及百分比。

攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒以及 ganciclovir 進行基因治療之癌細胞殺死效率：

在高密度細胞培養下的實驗：在 10 公分培養皿中分別置入  $1 \times 10^5$  的 GBM8401、GBM8804、及 GBM8909 細胞，以 moi 為 0、1、10、100、及 1000 的情況下進行「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒」感染；24 小時後開始進行 PBS 或 10  $\mu$ M ganciclovir (Syntex Laboratories, Inc. Palo Alto, CA, USA) 治療。每 2 天更換 medium 及補充 ganciclovir，10 天後計算細胞存活的數目；計算方式是以 10  $\mu$ M ganciclovir 治療 10 天後細胞存活的數目除以以 PBS 治療 10 天後細胞存活的數目再乘上 100%。

在低密度細胞培養下的實驗：在 10 公分培養皿中分別置入 200 個 GBM8401、GBM8804、及 GBM8909 細胞，以 moi 為 1000 的情況下進行「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒」感染；24 小時後開始進行 PBS 或 10  $\mu$ M ganciclovir 治療。每 2 天更換 medium 及補充 ganciclovir，10 天後直接在培養皿上以 crystal violet 染色，計算細胞群存活的數目；只有多於五十個細胞的細胞群落(colony)才加以計數。

裸鼠動物模式的產生及攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒的轉導作用：

六到八週大的 F344-rnu/rnu 無胸腺裸鼠(Liang SC, 1997) (如圖一)以 Kentamine (20 mg/kg) 進行腹腔內注射，全身麻醉後將裸鼠頭部固定在立體定位頭架(Stoelting

Co. Wood Dale, IL, USA)上，總共 30 隻裸鼠，每個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株用 10 隻，頭皮切開後，先找到 Bregma (矢狀縫與冠狀縫合交會處)，然後向後 1mm 向外側 2mm 鑽一個直徑約 0.9 公釐的顱骨鑽孔，將 27 號平頭之顯微注射針 (Hamilton company, Reno, NV, USA)固定在立體定位架之操作手臂上，將 5  $\mu$ l 內含  $5 \times 10^5$  個人類多形性神經膠質瘤細胞株細胞之 Hank's balanced salt solution (HBSS)(GIBCO-BRL, Co. Grand Island, NY, USA)以 5 分鐘的時間緩緩注入基底核中，注射針之深度為自硬腦膜起向下 3.5 公釐，注射完畢後，針停留原地 10 分鐘，再以 10 分鐘的時間緩緩退出，頭皮再以 3-0 的尼龍線縫合。

七天後以同樣的三度空間立體定位參數進行重組腺病毒注射。但是注射深度較原來多 1 公釐，然後每 0.5 公釐注射 0.5  $\mu$ l，使得在注射針的管道內共有六個注射點，而且分佈均勻，10 分鐘注射完畢後停留 5 分鐘再緩緩拔出，頭皮再用 3-0 尼龍線縫合。病毒注射後 12 小時，將裸鼠隨機分成二組，一組接受腹腔內每天早晚二次、注射每公斤體重 15mg 的 ganciclovir，共 10 天；另一組只腹腔注射 PBS。在癌細胞注射後 24 天後，(如圖二)將裸鼠以 350 ml 生理食鹽水及 4% formaldehyde in PBS 進行心內全身灌注取腦後置於 10 %及 20 %之蔗糖溶液中，並冰凍於 tissue-Lek 包埋液(Miles, USA)中，先用腦模型切片機切出 1 mm 厚的薄片，再取具有代表性的薄片進行 4 $\mu$ m 的切片進行 Hematoxylin 及 eosin 染色；腫瘤影像掃描進電腦再以 UTHSCSA Image Tool for Windows (The University of Texas Health Science Center in San Antonio, TX, USA)進行面積的測量，再據此計算出整個腫瘤的體積。

在細胞株組織培養中觀察旁觀效應：

第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的 cDNA 是經由聚合酶連鎖反應以 Ad-RSVtk DNA 為模板所合成，再將 HSV-tk 的 cDNA 植入 pCEP4 中；利用 tk/pCEP4(如圖四)來轉染 GBM8401、GBM8804、及 GBM8909 細胞株，以 hygromycin 處理兩週後，收集存活的細胞並分別命名為 GBM8401/tk、GBM8804/tk、及 GBM8909/tk。這些含有 tk 基因

的細胞再經過 10  $\mu\text{M}$ 濃度的 GCV 測試，證實這些細胞在 0.4 M 的 Hygromycin 下會存活，而 10  $\mu\text{M}$ 的 GCV 下三天百分之百會死亡的細胞株才作為實驗的材料。

本實驗是以經基因工程修改過的人類多形性神經膠質瘤細胞株(GBM8401/tk、GBM8804/tk、GBM8909/tk)與原始型人類多形性神經膠質瘤細胞株(GBM8401、GBM8804、GBM8909)，以不同的比例，在同一個 3.5 cm 培養皿中共同培養，並加入 ganciclovir 10  $\mu\text{M}$  治療十天後，以 trypsin 將細胞分離下來，計算細胞數目。以此作為 spy therapy 的基礎(如圖三)。

## 抗血管新生策略

### 背景

抑制血管內皮新生的特殊基因療法：

在人體全身上下到處都有一些叫作微血管(capillary)的微小血管叢，它可以攜帶營養物質到全身組織中，也可以將代謝後之廢物帶離組織。在正常情況下微血管叢之數目及尺寸大小不會增加，這是因為構成微血管的血管內皮細胞不會分裂(divide)；但是在一些特殊的正常生理狀況下：如婦女月經週期的子宮內膜微血管，或是一些受到外傷被破壞的組織中可以看到微血管大量增生；這個增生的過程叫作血管新生(angiogenesis)或新血管形成(neovascularization)，這個過程大約持續一或二週即自動停止。

血管新生(angiogenesis)也就是指血管內皮細胞(endothelial cells)增生(proliferation)的一個過程，這樣可以形成一個原始型的血管床，然後再由平滑肌包圍構成一個新的血管。在一些特殊的正常生理狀況下也會有血管新生現象(angiogenesis)，譬如婦女月經週期及懷孕期間的子宮、生長發育、傷口修補、組

織再生等(Hanahan et al., 1996)；在一些不正常的情況，人體也會發生血管新生現象，如糖尿病性視網膜病變及癌症(Folkman J., 1971; Folkman J., 1992; Folkman J., 1995)。腫瘤內之癌細胞可以「打開」血管新生的鎖鑰而造成大量的新生微血管生成，並將大量的新鮮營養物質及一些蛋白質如生長因子(growth factors)之類帶進腫瘤內而使腫瘤迅速長大。直接的實驗證據顯示：不論是腫瘤生長及轉移的過程，均需要新的微血管生成(Hanahan et al., 1996; Folkman J., 1995; O'Reilly et al., 1994)，而一個沒有新微血管生成的腫瘤，其尺寸很少大於 2-3 立方公釐，內含的癌細胞也不超過幾百萬個(Folkman J., 1995)；一旦有新微血管在腫瘤內部形成，腫瘤腫塊的體積即迅速長大，由顯微大小長至肉眼可辨的體積(Hanahan et al., 1996; Folkman J., 1995)。事實上，血管新生這個過程對於腫瘤之生長：由小而無害的一群基因有突變的細胞，過渡到大而惡性不可收拾的四處亂竄、到處轉移的惡性腫瘤，是非常具有關鍵性的。早期的癌細胞群在正常體內是無法刺激血管新生的，而始終維持如一小顆花生米一般大，不會繼續長大；但是一旦有新的微血管長進癌細胞群中，則癌細胞就大量增生繁殖形成大的腫瘤而且愈長愈大，到處轉移。所以如果能研究找出基因突變的癌細胞是如何「促成」(trigger)血管新生的機轉，而能將這個重要的過程打斷，甚至停止，則無異開啟了另一個治癌症的希望之窗。這個策略理論上最好只能阻斷癌細胞群不斷長大，而不影響原來已經存在於各組織中的微血管。在正常情況下(出生後及健康情況)血管內皮細胞是不會自己分裂增生的，除了在傷口癒合及婦女生育週期外，幾乎所有的成年人血管新生現象都是病理性的，如導致腫瘤的生長及眼內新血管生成。而抑制病理性的血管新生現象是一個很有效的治療策略；相反地，若加強血管新生現象則可以加速傷口的癒合及拯救缺氧的組織。

形成新生血管的過程是相當精密且環環相扣的，調控血管新生的機轉則需要促進血管新生與抑制血管新生二股力量，包括了正及負的調控機制。內生性的刺激血管新生的蛋白質，包括 basic fibroblast growth factor (bFGF)及 vascular endothelial growth factor (VEGF)；而內生性抑制血管新生的蛋白質包括了

angiostatin 及 bFGF soluble receptor。在腫瘤中，最能激發血管新生的物質則以 VEGF (vascular endothelial growth factor), vascular permeability factor 及 FGFs (fibroblast growth factors) 為代表(Kandel et al., 1991; Ferrara et al., 1992; Dvorak et al., 1995)。腫瘤可分泌一個或一個以上的促進血管新生的物質，而與其它因素協同，使腫瘤的生長更形提昇。雖然過度產生(overproduction)的促進血管新生物質對於血管新生開關(angiogenic switch)是必需的，但是靠此單一條件仍不足以讓腫瘤開始有大量新生微血管生成，而內生性抑制血管新生的物質的存在，仍扮演了重要的角色。

在早期，學者們曾以為腫瘤內的豐富血管網是原來已經存在於人體的血管，因腫瘤導致之「發炎性血管擴張」所致，對腫瘤本身沒有什麼益處；到了1971年Folkman才提出了一個假說：「惡性腫瘤除非利用某些不知道的機轉，誘發了周圍已存在的血管，產生了有如發出新芽一般的新生的微細血管網，否則惡性腫瘤(癌細胞)無法長大到臨床上可以偵測到的尺寸」(Folkman J, 1971)。後續的觀察也證實在「新生血管」(neovascularization)這個步驟尚未到達前，腫瘤的尺寸很少會大到直徑數公釐以上，而其主要的營養及氧氣供應是靠由外向內的擴散(diffusion)作用；當其中的某些癌細胞因為缺氧或其它因素，改變了癌細胞的表現型(phenotype)而誘發了VEGF及其他生長因子(growth factors)的RNA表現，進而能轉譯(translation)出一些蛋白質產物，開始了血管新生的步驟。Folkman J也提出了他的觀察：「腫瘤細胞可以過度表現(overexpress)一個或多個促進血管新生的蛋白質，也可以自細胞外間質(extracellular matrix)中，藉著某些不知名的機制，將一些促進血管新生的物質送進入循環中，也可以藉著經由如巨噬細胞等的作用，生成自己的促進血管生成蛋白質，或三者相加相協同來達到促進新生血管的目的(Folkman J, 1995)；一旦新生血管網形成，腫瘤內的氧氣及營養物質的灌注(perfusion)和代謝廢物的移除均可大幅改善而使腫瘤發生迅速生長及轉移。新生的血管結構並不十分完整，其基底膜(basement membrane)是片段的(fragmented)，極易被癌細胞穿透而使癌細胞經由血

路到處轉移(Gastl et al., 1997)。

臨床上應用「抑制血管新生」策略來治療疾病是始於1989年，利用干擾素- $\alpha$ 來治療會危及生命的嬰兒血管瘤(infantile hemangioma)。嬰兒血管瘤是一大群非癌細胞的良性血管腫瘤，一個由大量血管不正常增生及一大群微血管皮不斷增生的皮膚病變；若是大量的循環血液流入這個血管瘤，而造成動靜脈瘤管，嬰兒是會因心臟衰竭而死亡的。干擾素可以抑制人類腫瘤細胞產生 FGF，在血管瘤中分泌出最能刺激血管新生的是 bFGF，而干擾素 $\alpha$ -2a 可以造成腫瘤明顯縮小(Ezekowitz et al., 1992)；其它以干擾素來治療 hairy cell leukemia、慢性骨髓性白血病(chronic myelogenous leukemia)、及 kaposi sarcoma 均有效果。1992 年第一個應用到癌症病人身上的抗血管新生的藥物是 TNP-470(是一種 substance fumagillin 的合成類似物質)。其它也有類似抑制血管新生的物質，包括了干擾素-12, fumagillin、TNP-470、matrix metalloproteinase inhibitor、integrin  $\alpha\beta$ 3、tumor necrosis factor、retinoids、thalidomide、thrombospondin、angostatin、及 endostatin 等等。

癌細胞的轉移也需要血管新生，在癌症進行的過程中某些正常生物過程被扭曲，其中最重要的是調控血管新生的機制被改變了。微血管的直徑比頭髮還細，而且可以說人體內每一個正常的細胞都直接與微血管表面相接觸。如果一個健康正常的細胞變成癌細胞而開始迅速分裂，其子細胞就聚集成微小的癌細胞群，當這些癌細胞群愈聚愈多，則它們離微血管愈來愈遠，當這類細胞聚集了有好幾百萬個以後，形成小的腫瘤就被稱作原位癌(carcinoma in situ)。在這個階段，腫瘤(原位癌)停止擴張，體積大小達到平衡—死去的細胞數與新增生的癌細胞數剛好相等，限制腫瘤體積不會無限制變大的原因，部分是由於腫瘤擴張太快，以致無法迅速得到營養，如蛋白質生長因子、及氧氣。在某些部位，如皮膚或子宮頸這類的「原位癌」可以被發現，但在乳房、肺、大腸這類的「原位癌」則不易被發現而可以存在數年之久。在維持這個穩定狀態數月或數年之後，這些原位癌「突然」誘發了大量微血管新生，

並且開始向四周的組織開始侵犯；這表示此時之癌細胞群開始釋放出一些可促進血管新生的蛋白質，或是誘發腫瘤附近的巨噬細胞釋放出一些血管新生蛋白質。光是有促進血管新生的蛋白質仍不見得能激化(trigger)血管新生，因為學者們發現在腫瘤細胞可以分泌二種蛋白質，一類可促進新血管生成，而另一種蛋白質可以抑制這個作用；這二種蛋白質的交互作用決定了血管新生的開關是開或關，這就是血管新生開關理論(angiogenic switch)。一旦最後角力的結果決定要往血管新生的方向走，數以百計的新生微血管立即佈滿整個微小的腫瘤，而每一條新生的微血管上也覆上厚厚的快速分裂的癌細胞，此時腫瘤快速長大不到一個月的時間可長到一立方公分而含有數億個癌細胞；更進一步地分析這個過程，這些新分裂的血管內皮細胞可釋放出至少六種不同的蛋白質來刺激癌細胞的增生及活動力。如乳癌內的微血管內皮細胞可以誘使癌細胞製造 IL-6 而大大增加了癌細胞轉移的機率，而轉移出去的癌細胞到了目標區，又進行「血管新生」而長成大的腫瘤；有一些轉移出去的癌細胞本身並不會促進血管新生而留在目標區冬眠多年，一旦原始腫瘤被治療或切除後，轉移出去的病灶即變成有血管新生而愈長愈大；此時臨床上可以診斷出腫瘤的存在，而腫瘤也造成許多臨床上的症狀。

在目前，任何病人被診斷出患有癌症，通常先進行手術切除再加上放射治及化學治療，以求一網打盡體內所有的癌細胞。抑制血管新生的治療策略本身並不是要摧毀腫瘤，而是藉著減少、或阻斷其血液供應而達到使腫瘤縮小及不再生長的效果；這個策略可以使腫瘤周圍，不再產生新生血管，而且可以把原先已存在的供應癌營養的不正常微血管網加以破壞。傳統上治療癌症都是以治療腫瘤內的癌細胞(惡性細胞)為主，其效果無法令人滿意；若是把治療癌症的目標改為針對腫瘤內之良性細胞(血管內皮細胞)，使「血管新生」這個造成腫瘤迅速長大及轉移之關鍵步驟停止，是否對於治療癌症上也有正面的幫助呢？許多學者提出了以下三個策略來抑制血管新生：

- 1) 抑制由癌細胞直接分泌的促進血管新生物質或是中和(neutralization)這些物

質。

2) 抑制血管內皮細胞增生及遷移(migration)。

3) 抑制血管基底膜(basement membrane)的合成及替換(Gastl et al., 1997)。

控制血管新生之策略與控制癌細胞增生是不同的，抑制血管新生的藥物可以和傳統上所用的化學治療藥物互用，因為它本身不會產生抗藥性，而且對許多的腫瘤都有效果(Boehm et al., 1997)。單純的血管新生抑制物質可以藉著阻止新生血管形成而不影響原來已有的血管(靜止不再分裂的血管)，進而達到冬眠(dormant)狀態；但是 angiostatin 及 endostatin 卻可以使腫瘤體積縮小(O'Reilly et al., 1996; Boehm et al., 1997)。最新的研究顯示 endostatin 有雙重作用，一方面是抑制血管新生，同時對腫瘤內的新生血管有毒性作用，而使得以 endostatin 治療的腫瘤可能死於細胞凋亡(apoptosis)或是壞死(necrosis)。

Angiostatin 是一個由 O'Reilly MS 在小鼠小便中所純化出的一個蛋白質，是已知血管新生抑制劑中效果最強的，它可以阻止大的腫瘤及其轉移病灶中絕大部分的血管生長，而且它的專一性很高，只可以作用於分裂增生旺盛的血管內皮細胞，使其不再分裂，而不作用於其它細胞，或已不再分裂生長的血管內皮細胞上；在動物身上以 angiostatin 進行癌症治療研究，也幾乎沒有什麼毒性作用，也不會有抗藥性(resistance)出現；Angiostatin 是另一個大的蛋白質 plasminagen 中的一段(plasminagen 本身沒有任何抑制血管新生的作用)。

在某些情況下有些腫瘤的生長會受到腫瘤本身所抑制，O'Reilly 等人發現了一個動物實驗的模式：「小鼠的路易氏肺肉瘤—低轉移性細胞株 (Lewis lung carcinoma-low metastatic strain)」，這個原發性的肺部腫瘤可以抑制遠端的轉移病灶；學者們自有這一個原發性的肺部腫瘤的小鼠的尿液中分離，純化出一個蛋白質，這一個蛋白質可以抑制「血管新生」(angiogenesis)以及第二個腫瘤的轉移。

在諸多小鼠肺癌動物模式中，患有不同變異型的路易氏肺癌小鼠動物模式是最具有抑制肺轉移特性的，而切除原發性腫瘤，會導致轉移性病灶迅速長大，如將路易氏肺癌細胞株植入 C57BL6/J 小鼠的背上，可以形成可見的腫瘤。將小鼠背上的發性瘤切除，可導致肺部轉移病灶迅速增大，抑制轉移性病灶的生長並不依賴完善的免疫系統；因為在完全沒有 T 細胞及 B 細胞的 SCID (Severe Combined Immunodeficiency) 小鼠身上也有相同的發現。組織學研究顯示，原發性的腫瘤是藉著抑制新血管生成達到抑制轉移性病灶生長的目的，它並不能阻止轉移性的癌細胞到達肺中。而原發性的腫瘤藉著某些機轉，如細胞凋亡(apoptosis)，影響細胞死亡的速度而達到抑制轉移性病灶生長的效果；若將原發性腫瘤切除後，轉移性病灶內之細胞凋亡(apoptosis)減少，而達到增加血管新生(neovascularization)。

造成這些現象的原因是由於長有原發性腫瘤的小鼠的血及尿中的某項物質具有抑制血管新生的特性，將長有原發性腫瘤小鼠身上取出的血清及濃縮後的尿液，再注射入已把原發性腫瘤切除的小鼠腹腔內，也會造成肺的轉移性病灶，因「血管新生」受到抑制，而始終維持既有尺寸而不會無限制地長大。利用齧齒類 basic fibroblast growth factor 角膜血管新生實驗，可以發現如果把長有原發性腫瘤小鼠的血及濃縮尿液注射到小鼠腹腔，其角膜上因為植入帶有 basic fibroblast growth factor 的小金屬片，而誘發的血管新生反應也會被抑制。Basic fibroblast growth factor 在培養皿中可以誘發牛的微血管內皮增生(proliferation)，但是加入了長有原發性腫瘤小鼠的血或濃縮尿液，則這種血管內皮增生現象也會被抑制。以上的種種證據顯示：在長有路易氏肺癌細胞株(Lewis lung carcinoma)的小鼠身上，一定有一個存在於血液循環及尿中的物質具有可以抑制血管新生的特性，在正常的小鼠及腫瘤已被切除的小鼠身上，則沒有這個物質存在，而且這個物質作用之機轉與免疫反應無關。

由這些血清及尿液中以 sequential heparin-sepharose chromatography、Bio-gel A, 0.5-m agarose chromatography、及 C4 reverse-phase chromatography, 序列有 98 %與 plasminogen 基因序列內的一段相符合, O'Reilly 將它命名為 angiostatin; 將人類或啮齒類 plasminogen 中的相同的一段蛋白質, 也有強烈的抑制微血管內皮細胞增生的功能, 但完整的 plasminogen 蛋白質則無此功能; 由人類 plasminogen 所純化出的 angiostatin 用到啮齒類身上, 仍是有很好的抑制轉移性病灶生長效果, 而且對於非血管內皮細胞也沒有作用。用 plasminogen 抗體可以除去人或鼠類尿中之 angiostatin, 而除去讓血管內皮細胞增加及增加轉移力的效應, 所以學者們認為 angiostatin 就是原發性腫瘤中可以抑制轉移性病灶長大的主要因子。

Angiostatin 不只可以使小鼠實驗性腫瘤停止生長, 而且能使腫瘤萎縮(O'Reilly et al., 1996), 其作用機轉是使血管新生停止(angiostatic), 而不是殺死新生血管(angiocidal); 而另外一個抑制血管新生的蛋白質 endostatin, 效果似乎比 angiostatin 強。endostatin 可以將小鼠身上的腫瘤縮小到顯微尺寸, 而在治療過程中不會復發(O'Reilly et al., 1997), 這類抑制血管新生蛋白質作用的機轉與 metalloproteinase inhibitors 類似, 它能干擾 extracellular matrix 的再塑形(remodel); angiostatin 是來自 plasminogen, 而 endostatin 來自 collagen XVIII, 且這二者都是 extracellular matrix 中重要的成分。這些自由浮動的蛋白質片段包圍了一些酵素的活性部位, 使這些酵素失效, 而這些酵素的作用可以將 plasminogen 及 collagen XVIII 切成小片段, 並破壞細胞間質(matrix), 防止血管內皮細胞形成新生血管網(Baringa M, 1997)。

採用基因治療的方法來進行抑制腫瘤內血管新生治療策略的特殊目的:

血管新生(angiogenesis)是一個非常複雜的步驟: 包括:

(1) 內皮細胞的激活(activation)、增生(proliferation)、及移動(migration)。

(2) 血管基底膜(vascular basement membrane)破裂。

(3) 小血管及微血管網的形成。

(4) 新生成的血管網組織與原有血管網組織相交通。

這四個步驟對固體實質腫瘤(solid tumor)繼續不斷地維持生長非常重要(Folkman J., 1990; Folkman et al., 1992; Folkman J., 1992; Denekamp J., 1993; Folkman J., 1995); 只要腫瘤體積長到 1~2 立方公厘以上, 則必需要靠新生血管的生成來維持腫瘤之生長(Folkman et al., 1966), 所以「抑制血管新生」, 也可以達到抑制腫瘤生長的效果(Pluda JM., 1997; Bicknell et al., 1992; Scott et al., 1994; Fan TP., et al 1995; Folkman J., 1995; Folkman J., 1997; Gastl et al., 1997)。

在抑制血管新生的策略上, 有幾項要注意的地方:

(1) 這類抑制血管新生的物質其生物活性的半衰期必需比腫瘤的「血管新生前期表現型」(proangiogenesis phenotype)要長。

(2) 這類物質必需要能在不同的腫瘤上發生作用。

(3) 這類物質不能妨礙正常生理狀況下的血管新生作用。

要達到這三個必需具有的要件, 簡單來說, 就是要在腫瘤內局部濃度要高、作用時間要長; 在離腫瘤較遠的地方濃度則低至不會影響正常生理功能(如婦女生育週期、傷口癒合、生長發育等)(Kong et al., 1998)。

至於我們為什麼要採用基因治療的方式來傳送一些會生成抑制血管新生物質的基因呢? 這是因為以基因治療方式, 利用合適的載體, 將一些能產生抑制血管物質的基因傳送至腫瘤中, 這樣不但可以使目標區細胞內及附近局部的治療濃度提高, 且同時可以維持一段相當時間; 也有些學者利用全身散佈的方式, 將治療用基因、或一些蛋白質及藥物散佈至全身, 但是這個方式較傳統的直接注射重組蛋白質的方

式沒有什麼好處，而且只注射一針無法維持很長的作用時間。將一些能產生抑制血管物質的基因以基因治療的方式，送到腫瘤所在的位置、或附近使其能在局部產生高效率的抑制血管新生作用；這是一個很好的原則，也是一個值得研究的方向 (Kong et al., 1998)。以基因治療的方式來抑制固態實質腫瘤(solid tumor)的血管新生作用有如下好處：

(1) 基因治療可以避免全身給予抑制血管新生物質所造成之危險：在固態實質腫瘤的表現型中，一些基因的表現本身就會造成血管新生現象，同時在身體其他地方可能也正在進行生理性的血管新生過程，比如婦女的卵巢、子宮及因為血管阻塞而造成的缺氧及外傷等等 (Phillips et al., 1990; Brown et al., 1992; Ravindranath et al., Reynolds et al., 1992; Shweiki et al., 1992; Banai et al., 1994; Olson et al., 1994; Frank et al., 1995; Hang et al., 1995; Brogi et al., 1996; Tuder et al., 1995)。而且一些促進血管新生的物質，在正常生理狀況下，除了促進血管新生外也有許多其它功能，比如由巨球細胞前驅細胞 (megakaryocyte precursors) 及 CD34<sup>+</sup>幹細胞表現的 VEGF (Vascular endothelial growth factor)，及除了促進血管生成外也可以幫忙維持正常骨髓微血管內皮功能 (Alon et al., 1995; Mohle et al., 1997); bFGF (basic fibroblast growth factor) 同時也可以調控 mesenchymal 細胞的增生 (Folkman Jr., 1995; Morrison et al., 1995; Folkman et al., 1996)。VEGF 是目前已知功能最強的、具有專一性的 proangiogenic mediators，其功能為吸引單核細胞及減緩 dendritic 細胞的分化成熟 (Gruber et al., 1995; Gabrilovich et al., 1996)。若全身系統性地給予抑血管新生的物質會導致不好的抑制正常生理功能的後果；如 Klauber 等學者報告 (Klauber et al., 1997) 在未懷孕小鼠給予 AGM-1470 這類在體內能抑制血管新生，在體外能抑制內皮增生的 fumagillin 合成的類似物質，可以抑制子宮內膜成熟及黃體形成，在懷孕小鼠會導致胚胎生長完全停止。但是以基因治療方式將可生成抑制血管新生蛋白質的基因送到特定的器官，可導致這類具有治療性的蛋白質只有在這些特定的器官才會表現；而如何控制某些基因在某些器官才會表現則有賴載體的適當選擇，比如靜脈注射重組腺病毒載體約有

90 %攜帶的基因會在肝中表現 (Hirschowitz et al., 1995; Ohwada et al., 1996; Huber et al., 1994; Consalvo et al., 1995)。所以假設要利用抑制血管生成策略來治療肝癌或大腸直腸癌的肝轉移，則可以選用攜帶有能生成抑制血管新生蛋白質基因的重組腺病毒來達到治療目的。

(2) 以基因傳送的方法可以造成具有抑制血管新生功能的蛋白質在局部堆積：以抑制血管新生的藥物全身性給予，無法在局部達到高的藥物濃度，而為了增加局部藥物的濃度，一味地增加劑量，反而更加強了全身的毒性作用；將基因傳送到特定的器官則完全免除了以上的麻煩。以低劑量的抑制血管新生策略的基因治療，就可以達到局部腫瘤縮小的效果。

(3) 旁觀效應：在以抑制血管新生的方式，來抑制腫瘤生長的基因治療策略，旁觀效應也扮演了重要的角色，因為以現行基因傳送的科技，是不可能把治療基因傳送到每個目標細胞上的，譬如在乳癌的實驗動物模式中，以脂肪體攜帶 p53 基因來進行轉染(transfection)，只有 5 %的癌細胞被轉染到，但是卻在腫瘤內減少了 60 %的血管量 (Xu et al., 1997)。

(4) 以基因治療的策略進行抑制血管新生，有另一個好處，就是只要基因的表現是持續的，就可以在局部達到持續的抑制血管新生的作用。目前的了解，所有的抑制血管新生治療方式都是 cytostatic 而不是 cytotoxic，所以延長治療物質的生物活性半衰期，對成功的抑制腫瘤「再」長大非常重要；只要長期在腫瘤內部或附近維持能抑制血管新生蛋白質的濃度，就可以長期抑制腫瘤長大 (Folkman et al., 1992; Folkman J., 1997; Gastl et al., 1997)。如果直接用合成蛋白質或藥物來治療，就要設計複雜的給藥方式及灌注時間才能勉強維持在全身及組織中的藥物濃度 (Tanaka et al., 1997)。基因傳送的策略，具有能在局部長期持續釋放抑制血管新生蛋白質的潛力及可以對抗腫瘤表現型中 proangiogenesis 的能力；自基因傳送

後治療性蛋白質要多久才能表現及可以持續多久則有賴下列因素決定：

- (1) 載體的性質。
- (2) 被轉染細胞的生物活性及該細胞對載體的反應，其基因表現的機轉究竟是植入 (integration) 或非植入 (non-integration)。
- (3) 被轉染成功的細胞的被清除率。
- (4) 功能性基因表現的情況及轉染後產生治療用蛋白質的多少。也就是說如果選擇的是可以植入細胞染色體的載體 (如反轉錄病毒載體)，若一旦轉染成功 (ex vivo 方式)，只要細胞存活則永遠可以表現出治療用蛋白質；若是採用非植入性載體 (如腺病毒載體)，因非常容易被免疫反應所清除，則需反覆進行基因傳送以達成效果 (Mulligan RC., 1993; Kozarsky et al., 1993; Smith AE., 1995; Wang et al., 1996; wilson JM., 1996)。根據 Cao 的報告，50 % 的新生血管減少就可以造成 77 % 腫瘤的縮小，這種相乘效果是相當令人鼓舞的。
- (5) 適當的設計抑制血管新生基因調控方式使得臨床醫師可以依據病人的臨床狀況來「調節」治療性基因的表現，譬如使用誘導性啟動子 (inducible promoter) 來進行調控。當病人臨床症狀出現，腫瘤有復發跡象時，可以服用一些藥物來「打開」治療用基因，而生產出治療用蛋白質，達到治療效果。

人類的惡性膠原細胞瘤其生物行為是最惡性的而且也是高度血管密佈的實質腫瘤 (solid tumor) 之一，雖然在影像診斷、手術技巧、及各種治療方法的努力下，近 20 年來，平均存活率仍是只有 12-18 個月左右 (Black P.M., 1991)。所以採用抑制血管新生的策略，如系統注射 angiostatin，其效果可抑制惡性腦瘤，而且這個效應不受血腦障蔽的影響 (Kirsch et al., 1998)；但系統注射 angiostatin 這個 38 KDa 大小的蛋白質，其對全身的毒性或副作用太大，所以以基因治療的方式直接將能生成 angiostatin 蛋白質的基因送至病灶區或其附近，也一樣可以達到效果。

不論 angiostatin 或是 endostatin 都是一種分泌性的蛋白質，可維持血管內皮細胞在一安靜(quiescent)狀態。Angiostatin 是一個 38 KDa 大的蛋白質，它的核酸序列與 plasminogen 中的前四個 Kringle 結構相同 (Tanaka et al., 1997; O'Reilly et al., 1994; O'Reilly et al., 1996; Sim et al., 1997)，而 angiostatin 是由 plasminogen 的 elastase 所切出來的(O'Reilly et al., 1994)。這二個分子具有完全不同的生物功能，不論 plasminogen 或 plasmin 都沒有抑制血管新生的功能，而 angiostatin 也完全沒有抑制血液凝固的功能(O'Reilly et al., 1994)，angiostatin 作用專一於血管內皮細胞而不直接影響腫瘤細胞本身，在長有腫瘤的小鼠身上給予 angiostatin 會抑制腫瘤血管新生並增加腫瘤內細胞之細胞凋亡比率 (apoptotic rate) 導致冬眠 (tumor dormancy)；而 endostatin 是一個 18 KDa 大小的蛋白質是由 enzyme 自 collagen XVIII 中所切出，也具有抑制血管新生的作用(O'Reilly et al., 1997)。

要以抑制血管新生這個策略進行基因治療，首先重要的是一定要儘量維持其功能愈久愈好 (Folkman et al., 1992; Gastl et al., 1997)。要達到此目的在設計上要注意以下幾點：

- (1) 在設計及選用載體時，希望其進入細胞的效率愈高愈好，而且愈容易進入細胞核內愈好。
- (2) 永遠的把植入的治療用基因嵌入細胞的 genome 當中。
- (3) 載體儘量不要引發宿主的免疫反應。
- (4) 使用藥物減少宿主對載體的反應。
- (5) 找一個生物半衰期較長的抑制血管新生蛋白質及其基因。
- (6) 使用一個不會被宿主所關閉的啟動子(promoter)。
- (7) 最好的方式是利用合併療法，譬如抑制血管新生基因治療加上免疫基因治療；或抑制血管新生基因的治療加上自殺基因治療 (Hirschowitz et al., 1995; Ohwada et al., 1996; Huber et al., 1994; Huber et al., 1993; Moulten FL.,

1994; Trinh et al., 1995; Aicher et al., 1997., ; Boczkowski et al., 1996; Brossart et al., 1997; Chen et al., 1996; Henderson et al., 1996; Hsu et al., 1996; Reeves et al., 1996; Steinman RM., 1997; Wang et al., 1995)。

抑制血管新生的治療策略最適於小的腫瘤 (low tumor burden)，治療後可以藉著抑制微小轉移延長腫瘤冬眠 (dormancy) 的時間，所以實際應用上先使用傳統針對癌細胞的基因治療 (自殺基因治療，免疫基因治療)，使腫瘤大量縮小，再使用抑制血管新生基因治療來延長病人的存活率。

### 腺相關病毒(Adeno-associated virus; AAV)

基因治療是一種快速發展的技術，利用病人自己基因修飾過的細胞以提供預期的基因產物(如:蛋白質或 RNA)，而具有治療許多遺傳性或後天性疾病的潛力。目前將基因輸送至細胞內所使用的各種載體中，重組腺相關病毒載體被認為是安全、能嵌入細胞染色體的病毒載體，而且能傳送基因至分裂及不分裂細胞；然而，重組腺相關病毒繁瑣的製備過程，使得運用重組腺相關病毒於基因治療的研究，受到很大的阻礙。

目前使用的基因輸送系統(Roemer et al.1992)可分二種:一是物理性輸送系統(physical delivery system)，如:微脂粒(liposomes)；一是病毒性輸送系統(viral delivery system)，一般常使用的病毒性輸送載體有單純皰疹病毒(herpes simplex virus)、反轉錄病毒(retrovirus)、腺病毒(adenovirus)、腺相關病毒(Adeno-associated virus; AAV)等。病毒載體之所以能作為基因治療之工具在於它們與生俱有精確地將核酸(nucleic acids)送入哺乳動物細胞內的能力，且輸送過程較符合自然原則，但它們並非能將基因送入所有種類的細胞內(Bo et al, 1988)。譬如：單純皰疹病毒(Breakfield et al., 1991)本身只是感染神經細胞，較適合作為神經細胞的基因輸送工具，但其病毒基因對細胞的毒性很強，有致病性(Johnson et al.,

1992)；而反轉錄病毒可將基因插入宿主染色體內，被送入的基因在細胞內表現時間長，但反轉錄病毒(Miller et al.1990)只能感染分裂中的細胞，而神經細胞大都已不再分裂，因此不適合作為神經系統的基因輸送工具；腺病毒(Le Gal La Salle et al., 1993)的優點是它有非常高的感染率，傳送基因的效率(Akli et al., 1993)，其缺點在於無法插入染色體內，被送入的基因很快失掉，表現時間短(Neve RL., 1993)；至於腺相關病毒不會造成已知的人類疾病(Ostrove JM et al.1987)，且能專一性地插入人類染色體特殊位置上(Samulski RJ., 1993; Rizzuto et al., 1999)，只是在製造重組腺相關病毒時須較複雜的程序。基於以上優缺點比較，我們認為腺相關病毒較適合作為神經系統的基因輸送載體。

腺相關病毒(Adeno-associated virus; AAV)是一種對人體無致病性，具單股 DNA 的小病毒(Parvoviruses)，直徑為 20 nm，形態為不具外膜(nonenveloped)的二十面體(icosohedral)；約百分之八十的族群對 AAV 的血清反應呈現陽性反應，且截至目前為止未有研究報告發現與 AAV 有關的疾病(Ostrove JM et al.1987)。AAV 是一種缺損性病毒(defective virus)，因其無法自己完成繁殖性感染(productive infection)，生活史中需要單純皰疹病毒、腺病毒才能繁殖(Atchison et al., 1965; McPherson RA et al., 1985)。在 AAV 的生活史中，當只有 AAV 感染宿主細胞時，會插入宿主的染色體，進行潛溶途徑 (lysogenic pathway)(Cukor et al.1984)；其融入人類基因組時有明顯的部位特異性，雖然自然型的 AAV 能特異地融入人類染色體 19q (Samulski RJ., 1993)，改造過的 AAV 載體也被證實具有此能力(Rizzuto et al., 1999; Recchia et al., 1999)，腺相關病毒基因中的 Rep 68/78 及 AAV-ITRs 是負責此插入特異部位的關鍵基因(Recchia et al., 1999)。若有腺病毒感染，提供 *E1A*、*E1B* 等蛋白質，使 AAV 大量繁殖，同時產生腺病毒，因此稱之為腺相關病毒，它同時具有耐熱、耐酸的特性((Atchison et al., 1965)。

AAV 的結構全長約 4.7 kb，二端各有 145 bp 的 ITR(inverted terminal

repeat)(Lusby et al., 1980), ITR 的前125 個核苷酸會形成迴紋序列(palindromic sequence), 然後倒摺回去形成末端 hairpin 作為起始複製(replication)的引子(primer), 另外一個功能是作為包裹訊號(packing signal)(Bunter et al., 1992)。中間的 coding region 上有三個分別位於 AAV 基因組圖譜位置是 p5、p19、p40 的啟動子(promoter)(Bermonant et al., 1984; Berns et al., 1990), 並可分為二個主要的 open reading frames(ORFs), rep 基因段負責 DNA 複製, 及 cap 基因段則產生結構性蛋白質 capsid, capsid 會辨認二端的 ITR, 而將 coding region 包裹起來而成完整的病毒顆粒(virus particle)(Bunter et al., 1992); 利用此一特性, 將所需基因段和調控的啟動子取代原本的 rep 及 cap 基因段, 但該二個基因段是腺相關病毒生存所必須的, 因此另外將 rep 及 cap 基因段放置在另一個載體上, 稱為協助性質體(helper plasmid), 而產生重組的腺相關病毒 (recombinant AAV)。由於重組的腺相關病毒沒有 rep 及 cap 基因段, 因此感染細胞後也不會在細胞內進行複製。

重組腺相關病毒載體是一個令人鼓舞的發明, 它的好處是非致病性(nonpathogenicity)、低致免疫力(low immunogenicity)、廣泛的宿主範圍(broad host tropism)、及穩定的基因表現(stable expression of transgenes)。野生型腺相關病毒是屬於小病毒屬(parvovirus)的一個線形, 單鏈的 DNA 分子共有 4680 個核苷酸長度, 其中含有負責調控病毒複製的 rep 基因及負責結構蛋白製造的 cap 基因, 而本身有它自己的啟動子(promoter)來驅動。

重組腺相關病毒載體可以將外來基因送至許多完全成熟分化完畢的細胞中, 在體內(in vivo) 及體外(in vitro)其效率高而且可以長期表現, 它不但可以植入(integration)而且可以形成穩定的 episomes, 這二者都可以進行轉錄(transcription)而形成該基因所對應的蛋白質。

現行將基因輸送至細胞內所使用的各種載體中, 重組腺相關病毒載體被認為是

安全、能嵌入細胞染色體的病毒載體，而且能傳送基因至分裂及不分裂細胞；然而，重組腺相關病毒繁瑣的製備過程，使得運用重組腺相關病毒於基因治療的研究受到很大的阻礙。

### 實驗設計及方法

建立可以生成鼠 angiostatin 的 cDNA 及 mAngiostatin-HA/pGEM-T:

以 PCR 的方法利用鼠 plasminogen cDNA (ATCC 63112, Manassas, Virginia, USA) 作為模板 (template)，另外設計了二個引子 (primer) — [5'mAST](5'-ACGAAGCTTGGATCCATGGACCATAAGGAAGTA-3') 及 [3'mAST](5'-ACGTCTAGAGGATC CTTAGAGGCTAGCGTAATCCGGAACATCGTATGGGTATGTGGGCAATTCCCACAACA-3') 正好分別對應在鼠 plasminogen 的第 1 至第 6 及第 461 至第 466 個胺基酸上，兩端設計了 BamHI, Hind III, BamHI, Xba I 四個酵素切割處 (cutting sites)，後面再設計了一個 HA (hemagglutinin) 的附屬標籤 (tag) (Cao et al., 1998) (如圖十六)；PCR 出來的 cDNA 再接到 pGEM-T (Promega Corp., Madison, WI, USA) 這個載體上。以 T7 及 SP-6 (Promega Corp., Madison, WI, USA) 二個特別的引子 (primer) 來檢查 mAngiostatin-HA/pGEM-T 的核酸序列，選擇完全正確的 PCR 產物，再以 BamHI 酵素處理。以凝膠分離術 (Gel Isolation Method)，首先自 1% 凝膠中切下所需的 DNA (mAngiostatin-HA/pGEM-T/BamHI) 片斷並予以秤重，每 100 mg 凝膠加入 300  $\mu$ l 的 buffer QX1 及 10  $\mu$ l Qiaex II suspension 在 50°C 下使凝膠溶解，再以 14000 rpm 離心 30 秒並去除上清液；再加入 300  $\mu$ l 的 buffer PE 清洗沉澱物後，在室溫中以 10000 rpm 離心 30 秒並去除上清液，隨後加入 300  $\mu$ l 的 buffer PE 在室溫中以 14000 rpm 離心 30 秒，倒掉上清液並將 Eppendorf tube 倒置直到乾燥 (禁止使用真空乾燥) 之後，加入 20  $\mu$ l 的 TE buffer 在 50°C 下搖晃半小時，然後離心 14000 rpm 5 分鐘，取上清液到新的 Eppendorf tube 之中，來分離出 1.4 kb 大小的 DNA 片段。

#### 建立 mAngiostatin-HA/pCEP4:

先將表現型載體 pCEP4 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)以 BamHI 酵素處理再進行去磷酸根處理；以上述凝膠分離術(Gel Isolation Method)，來分離出一個 10.4 kb 大小的 DNA 片段；再將以 BamHI 酵素處理過的 1.4 kb 大的 mAngiostatin-HA 與 10.4 kb 大小的 pCEP4/BamHI 相重組，形成一個 11.8 kb 大小的質體(mAngiostatin-HA/pCEP4)(如圖十七、圖十八)。

#### 建立可以生成鼠 angiostatin 的 cDNA 及 mAngisotatin-HA-N/pGEM-T:

以 PCR 的方法利用鼠 plasminogen CDNA (ATCC 63112, Manassas, Virginia, USA) 作為模板 (template) 設計了二個引子 (primer) — [5'-mAST-N] AAGGAAAAAGCGGCCGCATGGACCATAAGGAAGTA 及 [3'-mAST-N]TGTTGTGGGAATTGCCACATACC CACATACGATGTTCCGGATTACGCTAGCCTCTAACGGCCGCAAAGGAAAA，正好分別對應在鼠 plasminogen 的第 1 至第 6 個及第 461 個至第 466 個胺基酸上，兩端設計了 Not I 的酵素切割處(cutting sites)及一個 HA (hemagglutin)的附屬標籤(tag) (如圖十九)；PCR 出來的 cDNA 再接到 pGEM-T 這個載體上(Promega Corp., Madison, WI, USA)。以 T7 及 SP-1 (Promega Corp., Madison, WI, USA)二個特別的引子(primer)來檢查 mAngiostatin-Ha-N/pGEM-T 的核酸序列，選擇完全正確的 PCR 產物再以 Not I 酵素處理，同樣以凝膠分離術(Gel Isolation Method)來分離出 1.4 kb 大小的 DNA 片段。

#### 建立 mAngiostatin-HA-N/pXX:

先將 pXX-Uf1 質體以 Not I 酵素處理再進行去磷酸根處理；以凝膠分離術(Gel Isolation Method)分離出一個 6.6 kb 小大的 DNA 片段。將以 Not I 酵素處理過的 1.4kb 大的 mAngiostatin-HA/NotI 與 10.4kb 大小的 pXX/Not I 相重組形成一個 11.8 kb 大小的質體(pXX-mAngiostatin-HA) (如圖二十)；其中含有 CMV 啟動子(promoter)。再以 Pvu II 及 Sca I 酵素來確認啟動子驅動之方向(orientation)是否正確。

建立基因重組帶有 mAngiostatin-HA 的細胞株：

以將 mAngiostatin-HA/pCEP4 以 CaPO4 沈澱轉染法分別轉染 C6, GBM8401, GBM8804, 及 GBM8909 細胞株。在轉染的前一天, 將生長至 60-70 %滿的細胞用胰蛋白酶(trypsin)打下來, 平均分配到直徑 100 mm 培養皿之中, 使每個培養皿約  $1 \times 10^5$  個細胞, 放於 37°C, 5 %二氧化碳培養箱內培養。第二天在轉染之前 1-3 小時將培養液吸掉, 加入 5 ml 的新鮮培養液。轉染實驗開始時, 先配置轉染 cocktail, 方法如下: 將 mAngiostatin-HA/pCEP4 20  $\mu$ g 加上 0.5 ml 的 0.25 M  $\text{CaCl}_2$  放置在 15 ml Corning tube 中: 再將 2 X HEBS buffer saline 0.5 ml 放置於 15 ml Corning tube 之中, 在試管混合器搖盪之下以慢速將 Corning tube 之中的 DNA/  $\text{CaCl}_2$  混合液慢慢的滴入 15 ml Corning tube 中, 靜置 19-20 分鐘後將此轉染 cocktail 慢慢滴入含 5 ml 細胞培養液的培養皿中, 放置 37°C, 5 %二氧化碳培養箱中, 8 小時後換新鮮培養液, 最後將被轉染之細胞培養在 37°C, 5 %二氧化碳培養箱中。以 Hygromycin (400  $\mu$ g/ml) 進行選擇, 四週後挑出單一的細胞株, 進行免疫沈澱法偵測 HA 這個 tag, 選擇 HA 表現最多、最強的細胞株來進行實驗, 建立的細胞株命名為 C6/mAngiostatin-HA/pCEP4、GBM8401/mAngiostatin-HA/pCEP4、GBM8804/mAngiostatin-HA/pCEP4、及 GBM8909/mAngiostatin-HA/pCEP4, 另外以 pCEP4 進行相同的轉染及選擇過程作為對照組。

生產攜帶有 mAngiostatin-HA 的重組腺相關病毒：

293 細胞是人類胚胎腎細胞, 培養於含有 10 %胎牛血清(Fetal Bovine Serum; FBS) 的 Dulbecco's Modified Eagles Medium 培養液(DMEM), 其中每毫升的 DMEM 中加入 100 units/ml 青黴素(penicillin)及 100 mg/ml 鏈黴素(streptomycin), 細胞培養均置於 5 %二氧化碳之 37°C 培養箱內。細胞的次培養 (subculture) 乃利用 0.05 mM 胰蛋白酶(trypsin)和 2.5 mM EDTA 將細胞在培養皿中打散, 轉植到新的培養皿中。利用 Xiao Xiao 博士的新方法(Xiao X, 1998) (如圖二十一), 在進行轉染步驟(Transfection) 前 1-2 小時, 將 7-8 成滿, 內有 293 細胞的 15 公分培養皿中換成 10 ml 新鮮 Iscove

modified Dulbeuo medium (Gibco)，其中含有 10 % 的 fetal bovine serum (HyClone)，而不含有任何抗生素成份。將 pXX2 質體 9  $\mu\text{g}$ 、pXX6 質體 25  $\mu\text{g}$ 、及 pXX-mAngiostatin-HA 質體 16  $\mu\text{g}$  加入 1 ml 的 0.2 M  $\text{CaCl}_2$  中，並快速與 1 ml 的 HEPES-buffered saline (50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  [pH7.12]) 混合，滴入培養皿中，約 8-12 小時後再將培養液換成原來的 fresh Dulbeuo Modified Eagle medicem (Gibco)，其中含有 10 % 的 fetal bovine serum 及抗生素，約 60 小時後，以 rubber policeman 將 293 細胞刮下，低速離心後再用 1 ml 的 100 mM NaCl-10 mM Tris-HCl (pH8.5) 回溶，再進行四個週期的結凍解凍，並離心去掉細胞殘渣。以 CsCl 密度梯度純化法來純化重組腺相關病毒，純化出的重組腺相關病毒再以 slot blot 法測定其價效。

偵測 mAngiostatin-HA 的表現：

先將培養良好的細胞株：C6、C6/pCEP4、C6/mAngiostatin-HA/pCEP4， $1 \times 10^4$  個置入 10 公分直徑培養皿中，每隔二天以 trypsin 將細胞分離下來，以細胞計數玻片計算細胞數以訂出生長區線；然後分別收集細胞及條件培養液(conditioned medium)，以 12CA5 單源細胞株的條件培養液(conditioned medium)來偵測 HA。方法如下：

細胞蛋白質的收集：細胞以 4°C 的 3 ml 的 1 X PBS 清洗細胞二次，再加入 500  $\mu\text{l}$  RIPA buffer，內含 100 X 5 mg/ml 的 aprotinin 5  $\mu\text{l}$  及 500 X 25 mM 的 leupeptinin 1  $\mu\text{l}$ ，將細胞膜打破，用刮勺刮下收集於 1.5 ml 的 ependorf 離心管中，之後將其置於 -70°C 或直接做蛋白質的定量。

SDS 聚丙烯醯膠電泳法(SDS-PAGE): 首先架好電泳設備，並且配置下層 separating gel(10-15 %)，迅速倒入玻璃中，加入 1 X Running buffer 蓋住整個液面，待膠凝固定後將 1 X Running buffer 倒出，放入 comb，並配置上層的 stacking gel，速迅倒入玻璃夾層中，等凝固後小心把 comb 取出。取適量的蛋白質，於沸水

中加熱五分鐘，帶冷卻後即注入 well 中，以 120 伏特進行電泳，待跑到底部後將兩片玻璃打開，取出聚丙烯醃膠進行蛋白質轉移(transfer)及西方點墨法。

蛋白質轉移(transfer)及西方點墨法：將在 SDS-PAGE 中分離好的蛋白質在 4°C 下以 60 伏特 8 小時轉漬到 Nitrocellulose paper (Schlicher and Schuell)；待轉漬完成後取出 Nitrocellulose paper，為了確定轉漬是否完全，可先用 Ponceau S solution 來確定。而後將 Nitrocellulose paper 放於含有 0.5% 脫脂奶粉的 TBST 中，室溫反應 60 分鐘；再以 TBST 清洗二次，每次 15 分鐘；此時將 primary antibody (來自 12CA5 單源細胞株的條件培養液)以 TBST 稀釋，與 Nitrocellulose paper 在室溫下作用 60 分鐘，再以 TBST 清洗二次，每次 10 分鐘。取 secondary antibody 以 TBST 稀釋，在室溫下作用 60 分鐘，再以 TBST 清洗四次，每次 10 分鐘。最後加入 substrate 直到 Nitrocellulose paper 上有明顯的螢光 band 出現。

將 AAV-mAngiostatin-HA 以 moi 1000 感染 293 細胞 36 小時後再分別收集細胞及條件培養液(conditioned medium)，以上面的免疫沈澱法偵測 Angiostatin-HA 蛋白質的表現。

臍靜脈內皮細胞的初培養(primary culture):

取新鮮無菌的人類臍帶一條(如圖二十三)，在無菌操作下先置於 HBSS (Hank's balanced Salt Solution)中，將臍帶二端各剪去 1-2 公分，並用導管針插入臍靜脈中再以有一個小凹槽的止血夾夾住，由一端灌注 HBSS 直至沒有紅血球存在；用空氣將臍脈內之 HBSS 排空，再將 37°C 預熱好的 0.25 % trypsin 溶液灌入臍靜脈中，二端封好後將整條臍帶放入 37°C 保溫箱中 15 分鐘，然後用力按摩臍帶，仔細搓揉，然後再以空氣排空 trypsin 溶液，將混雜有臍靜脈內皮細胞的溶液收集到 50 ml 的離心管內，再利用 50-100 ml HBSS 沖洗臍靜脈將殘留的細胞沖出，也收集在 50 ml 的離心管內離心 500 g 10 分鐘，再以 HBSS 沖洗細胞沈澱二次(離心 500 g 10 分鐘)，

再以培養液回溶，以 10 × 10 公分高壓滅菌過之紗布過濾，置於培養皿內培養，培養液為 medium 199 (11150-059, Gibco BRL, Grand Island NY, USA)及 10 % heat-inactivated fetal bovine serum (26140-079, Gibco BRL, Grand Island NY, USA)。另外也將購自 ATCC 的 EV304 細胞(CRL-1998, ATCC, Rackville, MD, USA)一起進行實驗。

以臍靜脈內皮細胞的增生速率來測試 mAngiostatin-HA 的生物活性：

將臍靜脈內皮細胞  $1 \times 10^5$  分別置入六個培養皿培養碟(6-well-plate)之培養皿內，每二天加入新鮮收集的 C6/mAngiostatin-HA、C6/pCEP4、及 C6 培養皿中的條件培養液(conditioned medium)1.5 ml，加上培養臍靜脈內皮細胞的專用培養液 (medium 199+10 %FBS+PS) 1.5 ml，共每個小培養皿 3 ml 培養液，每隔二天以 trypsin 將細胞分離下來計算其數目；同時其餘的培養皿更換上述培養液。

將 AAV-mangiostatin-HA 以 moi 1000 感染臍靜脈內皮細胞，然後每隔二天換一次條件培養液(conditioned medium)，每隔二天用 trypsin 將細胞分離下來計算其數目。

基因重組帶有 mAngiostatin-HA 細胞株在 C6-Wistar rat 動物模式的生物效應：

將  $5 \times 10^5$   $5 \mu\text{l} \times \text{PBS}$  個基因重組過的 C6/pCEP4、C6/mAngiostatin-HA/pCEP4、野生型 C6 細胞株以立體定位的方法注射到 Wistar rat 的左側基底核中，共計 12 隻，每隔七天犧牲二隻，以  $1 \times \text{PBS}$  及 4 % formalin 心內灌注並取腦，先用腦模型切片機切出 1 mm 厚的薄片，腫瘤影像掃描進電腦再以 UTHSCSA Image Tool for Windows (The University of Texas Health Science Center in San Antonio, TX, USA)進行面積的測量，再據此計算出整個腫瘤的體積。

以攜帶有 mAngiostatin-HA 的重組腺相關病毒對 Wistar rat 腦中的 C6 惡性腦瘤進

行基因治療：

本實驗分成二組進行，第一組測試 angiostatin 對腦瘤細胞的生長有無抑制作用(inhibitory effect)(如圖二十四)，及第二組則測試 angiostatin 對現存的腦瘤有無縮小作用(shrinkage effect)(如圖二十五)。

A. 將野生型 C6 惡性腦瘤細胞  $5 \times 10^5/5 \mu\text{l}$  PBS 混合 AAV-mAngiostatin-HA  $5 \mu\text{l}$  ( $10^9$  viral particles/ $5 \mu\text{l}$ )，再一起以立體定位的方法注射到 Wistar rat 左側基底核中，共計 24 隻，每週犧牲四隻，進行  $1 \times$  PBS 及 4 % formalin 心內灌注，然後取腦，先用腦模型切片機切出 1 mm 厚的薄片，腫瘤影像掃瞄進電腦再以 UTHSCSA Image Tool for Windows (The University of Texas Health Science Center in San Antonio, TX, USA)進行面積的測量，再據此計算出整個腫瘤的體積。

B. 先將野生型 C6 惡性腦瘤細胞  $5 \times 10^5/5 \mu\text{l}$  PBS 以立體定位的方法注射到 Wistar rat 左側基底核中，共計 24 隻，一週後再用同樣的參數以立體定位法注射  $5 \mu\text{l}$  ( $10^9$  viral particles/ $5 \mu\text{l}$ )到腦內，然後每週犧牲四隻，進行  $1 \times$  PBS 及 4 % formalin 心內灌注，並取腦，先用腦模型切片機切出 1 mm 厚的薄片，腫瘤影像掃瞄進電腦再以 UTHSCSA Image Tool for Windows (The University of Texas Health Science Center in San Antonio, TX, USA)進行面積的測量，再據此計算出整個腫瘤的體積。

合併療法(Combined therapy)

#### 實驗設計及方法

在體內(in vivo)及體外(in vitro)測試重組腺相關病毒之轉導效率：

取  $1 \times 10^5$  個 293 細胞、C6、GBM8401、GBM8909、及人類臍靜脈內皮細胞(UVEC)

細胞株置於 10 公分直徑的培養皿中，在 moi 1000 的條件下以 AAV-pdxII lacZ、AdvlacZ、及 AAV-pd xII lacZ+Advtk 進行感染，48 小時後，進行 X-gal 染色計算藍色細胞的數目比例。

將野生型 C6 惡性腦瘤細胞  $5 \times 10^5/5 \mu\text{l}$  PBS 及 AAV- pdxII lacZ  $5 \mu\text{l}$  ( $10^9$  viral particles/ $5 \mu\text{l}$ ) 以立體定位的方法，注射到 Wistar rat 左側基底核內，共 3 隻，10 天後犧牲，並以  $1 \times$  PBS 及 4 % formalin 進行心內灌注，再取腦切片  $4 \mu\text{m}$ ，進行組織 X-gal 染色。

將野生型 C6 惡性腦瘤細胞  $5 \times 10^5/5 \mu\text{l}$  PBS 以立體定位的方法注射到 Wistar rat 左側基底核內，共計 3 隻，七天後再依相同方式，將 AAVlacZ  $5 \mu\text{l}$  ( $10^9$  viral particles/ $5 \mu\text{l}$ ) 注射到相同部位，三天後以  $1 \times$  PBS 及 4 % formalin 進行心內灌注，再取腦切片  $4 \mu\text{m}$ ，進行組織 X-gal 染色。

將野生型 C6 惡性腦瘤細胞  $5 \times 10^5/5 \mu\text{l}$  PBS、 $5 \mu\text{l}$  AAVlacZ ( $10^9$  viral particles/ $5 \mu\text{l}$ )、及  $5 \mu\text{l}$  Advtk ( $10^8$  viral particles/ $5 \mu\text{l}$ ) 共  $15 \mu\text{l}$ ，以立體定位方法，注入 Wistar rat 左側基底核內，共計 3 隻，10 天後犧牲，以  $1 \times$  PBS 及 4 % formalin 進行心內灌注，再取腦切片  $4 \mu\text{m}$ ，進行組織 X-gal 染色。

將野生型 C6 惡性腦瘤細胞  $5 \times 10^5/5 \mu\text{l}$  PBS 以立體定位的方法，注射到 Wistar rat 左側基底核內，共計 3 隻，七天後再依相同方式，將 AAVlacZ  $5 \mu\text{l}$  ( $10^9$  viral particles/ $5 \mu\text{l}$ ) 及 Advtk  $5 \mu\text{l}$  ( $10^8$  viral particles/ $5 \mu\text{l}$ ) 共  $10 \mu\text{l}$  注射到相同部位，三天後以  $1 \times$  PBS 及 4 % formalin 進行心內灌注，再取腦切片  $4 \mu\text{m}$ ，進行組織 X-gal 染色。

另外建立對照組：將野生型 C6 惡性腦瘤細胞  $5 \times 10^5/5 \mu\text{l}$  PBS 以立體定位

的方法，注射到 Wistar rat 左側基底核內，共計 3 隻，十天後以 1 x PBS 及 4% formalin 進行心內灌注，再取腦切片 4  $\mu\text{m}$ ，進行組織 X-gal 染色。

### 三. 結果與討論

#### 自殺基因策略

##### 初步成果

三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株生長速率：

在 10 公分培養皿中分別置放三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株 (GBM8401、GBM8804、及 GBM8909)  $1 \times 10^4$  個，再分別培養 2、4、6、8、10 天，以 trypsin 分離，然後再計算細胞數目，繪製生長速率圖。

結果如圖五顯示：GBM8401 生長速度最快，雙倍複製時間為 25 小時；GBM8804 雙倍複製時間為 29 小時；GBM8909 雙倍複製時間為 33 小時。

攜帶有 lacZ 基因的重組腺病毒對三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株轉導效率：

以攜帶有 lacZ 基因的重組腺病毒對三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株 (GBM8401、GBM8804、及 GBM8909)，在 moi 為 0、10、50、100、500、及 1000 的情況下進行轉染，在轉染後 36 小時，進行 X-gal 染色觀察轉染效率。

結果如圖六顯示：在 moi 為 500、及 1000 的情況下進行轉染，GBM8909 轉染效率最差；GBM8401 及 GBM8804 則差別較小。以 one-way ANOVA 方法進行統計分析在 moi 小於或等於 100 時，這三株細胞間之轉導效率並沒有顯著差別；但在 moi 500 及 1000 時，三種不同的細胞株間其轉導效率則有顯著差別 ( $P < 0.05$ )。在 moi 大於 500 以上

的情況對於細胞殺死的效應是必須的，以治療的角度來看，這三株不同的細胞株間在 moi 500 及 1000 時轉導效率不同是極具生物學意義的。

攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒以及 ganciclovir 治療對三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株進行基因治療之癌細胞殺死效率：

以攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒以及 ganciclovir 治療，對三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株(GBM8401、GBM8804、及 GBM8909)在細胞培養的結果。

重組腺病毒在不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株中的不同轉導效率，對於基因治療上的應用，有許多潛在問題，為了評估這三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株，對於以重組腺病毒為載體的基因治療有何影響，我們利用了以 RSV 做為啟動子，攜帶了 tk 基因的重組腺病毒載體及 GCV 這個藥物來進行殺死惡性腦瘤細胞的研究。

在 10 公分培養皿中分別置入  $1 \times 10^5$  GBM8401、GBM8804、及 GBM8909 細胞，以 moi 為 0, 1, 10, 100, 及 1000 的情況下，進行「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒」感染；24 小時後開始進行 PBS 或  $10 \mu\text{M}$  ganciclovir 治療，每 2 天更換 medium 及補充 ganciclovir，10 天後計算細胞存活的數目，計算方式是以  $10 \mu\text{M}$  ganciclovir 治療 10 天後細胞存活的數目除以以 PBS 治療 10 天後細胞存活的數目再乘上 100 %。

結果如圖七顯示：當感染之 moi 為 100 及 1000 時，這三株細胞株的存活率均不到 1 %，這表示雖然這三株不同的細胞株對於重組腺病毒載體之轉染效率不同，但其對 GCV 殺死的效果卻很接近。在 moi 為 1 及 10 的情況下，只有一部分的癌細胞被殺死，GBM8909 細胞是對 GCV 處理最敏感，而 GBM8401 細胞是最不敏感的；造成這個

細胞存活數與感染率相關的差異性主要由：1)不同細胞對 GCV 的敏感度不同，2)不同細胞間的旁觀效應(bystander effect)的強弱，3)不同細胞株間生長速率也不同。

總而言之，以 one-way ANOVA test 檢驗數據在 moi 為 100、500、1000 時，其對重組腺病毒載體轉導效率有差別(如圖六)，但是其細胞殘存比率卻沒有顯著差別(如圖七)；所以我們認為三種不同細胞株間轉導效率的不同，並不會影響細胞受到 GCV 處理後的死亡比率，這個效應可能歸因於這三株細胞株對 GCV 的敏感度不同，以及旁觀效應的強弱。

結果如圖七顯示：雖然在不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株(GBM8401、GBM8804、及 GBM8909)，對重組腺病毒的轉染效率有所差別，但在高密度細胞培養下進行的「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重组腺病毒」感染及 10  $\mu$ M ganciclovir 治療，其結果卻差別不大。

圖八表示在低密度細胞培養下的結果：在 10 公分培養皿中分別置入 200 個 GBM8401、GBM8804、及 GBM8909 細胞，以 moi 為 1000 的情況下進行「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒」感染；24 小時後開始進行 PBS 或 10  $\mu$ M ganciclovir 治療，每 2 天更換 medium 及補充 ganciclovir，10 天後，直接在培養皿上以 crystal violet 染色計算細胞群存活的數目，只有多於五十個細胞的細胞群落才加以計數。

攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒以及 ganciclovir 治療對三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株在裸鼠動物模式中腫瘤生長的效果：

為了更進一步的證實不同的轉導效率並不會在以重組腺病毒為載體的基因治療上造成不同的效果，我們採用了這三株人類的多形性神經膠質瘤細胞株在裸鼠的動物模式上進行實驗。

以 GBM8401 細胞  $5 \times 10^5/5\mu\text{L}$  PBS 注入裸鼠腦尾狀核內，七天後再注入  $4.8 \times 10^8$  「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重组腺病毒」病毒顆粒，12 小時後開始 ganciclovir 治療 (15mg/Kg, twice a day)，持續十天，治療停止後八天進行心內灌注及腦切片並測量腦瘤的大小(如圖二)。

在沒有接受治療的裸鼠，腦內的腫瘤長的相當巨大，而且有中心壞死的現象如圖九之 A；有接受治療的裸鼠，腦內的腫瘤長的小的多如圖九之 B。

如圖十顯示：GBM8401 細胞株，在體外有最好的重组腺病毒載體轉導效率，在體內經 GCV 治療後，有 80 %的腫瘤縮小比例；而 GBM8804 細胞株，在體外有相似的基因轉導效率，在體內經 GCV 治療後有 82 %的腫瘤縮小比例；GBM8909 細胞株在體外有最低的基因轉導效率，但在體內經 GCV 治療後卻有 91 %的腫瘤縮小比例。所以總而言之，這三株細胞株在體外的腫瘤縮小比例差別並不太大，表示這三株細胞株以重组腺病毒為載體的基因治療對腫瘤治療的效果也差不多。

結果如圖十一顯示：攜帶有 lacZ 基因的重組腺病毒對惡性腦瘤的轉倒效率極佳，而且造成腦瘤縮小的機轉是透過細胞凋亡(apoptosis)的途徑，由 TUNEL 染色可以證實。

在三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株組織培養中觀察旁觀效應：

由以上的實驗成果可以知道：GBM8909 細胞株雖然有最低的腺病毒轉導效率，但不論在體內或體外，均對於 HSVtk/GCV 的治療效果卻極為有效，這表示此類細胞毒性作用一定有其它因素造成，所以我們將相同條件下，200 個已經被攜帶有自殺基因的重組腺病毒感染的這三個細胞株，植入 10 公分直徑的培養皿中，使細胞間彼此不會接觸，再入 GCV 治療。由圖八：可以發現 GBM8909 細胞株比另外二個細胞株

有較低的 GCV 細胞毒殺效應，這表示細胞與細胞有直接接觸，並能增加 HSVtk/GCV 的細胞毒殺效應。由前人的研究中(Bi et al., 1993; Dilber et al., 1997)也發現，在高密度細胞共同培養，藉由直接細胞接觸下的旁觀效應，含有 tk 基因的細胞可以殺死旁邊不含有 tk 基因的細胞。由以上 GBM8909 細胞株的例子可以發現旁觀效應在以 HSV-tk/GCV 策略進行細胞毒殺基因治療時，扮演了非常重要的角色。

為了更深入地探討在相同細胞株培養下，不同比例之含有 tk 基因及不含有 tk 細胞株對 GCV 細胞株有何毒殺作用，如圖十二：10 %含有 tk 基因的 GBM8401 細胞與 90 %不含有 tk 基因的 GBM8401 細胞株共同培養加入 GCV 後，與 100 %不含 tk 基因的 GBM8401 細胞株相比，存活率只有 1.5 % (殺死了 98.5 %)。而如圖十五：相同條件下 10 %含有 tk 基因的 GBM8909 細胞株與 90 %不含有 tk 基因的 GBM8909 細胞株共同培養加入 GCV 後，與 100 %不含 tk 基因的 GBM8909 細胞株相比，存活率只有 1.7 % (殺死了 98.3 %)；但 10 %含有 tk 基因的 GBM8804 細胞株與 90 %不含 tk 基因的 GBM8804 細胞株共同培養加入 GCV 後，與 100 %不含 tk 基因的 GBM8804 細胞株相比，存活率只有 1.6 %。這些結果顯示在細胞培養中，只要十分之一的細胞帶有 tk 基因，即可在加入 GCV 後有效地殺死接近百分之百的細胞；這也足以解釋為什麼在圖七，GBM8909 細胞株有較低的重組腺病毒載體轉導效率，但可以有效地以 HSV-tk/GCV 策略來殺死癌細胞。

因為多形性神經膠質瘤是一個癌細胞成份及組成差異相當大的惡性腦瘤，其中有不同的基因變異、不同形態的細胞、不同生長速度及不同轉導效率，而這個特性在基因治療的實際應用上相當重要，所以我們更進一步地探討在不同的多形性神經膠質瘤細胞株彼此之間在共同培養下的旁觀效應有無差別。我們發現如圖十三：10 %含有 tk 基因的 GBM8401 細胞株與 90 %不含有 tk 基因的 GBM8909 細胞株共同培養在加入 GCV 後，與 100 %不含有 tk 基因的 GBM8909 細胞株相比，存活率只有 1.5 % (殺死 97.5 %)。如圖十四：10 %含有 tk 基因的 GBM8909 細胞株與 90 %不含有 tk 基因

的 GBM8401 細胞株共同培養在加入 GCV 後，與 100 % 不含有 tk 基因的 GBM8401 細胞株相比，存活率只有 1 % (殺死 99 %)；而 10 % 含有 tk 基因的 GBM8804 細胞株與 90 % 不含有 tk 基因的 GBM8401 細胞株、或 GBM8401 細胞株、或 GBM8909 細胞株共同培養，與 100 % 不含有 tk 基因的 GBM8401 細胞株或 GBM8909 細胞株相比，存活率為 2 % (殺死 98 %)、或 1.5 % (殺死 98.5 %)。所以我們認為旁觀效應不僅存在於同種細胞株間，同時存在於異種細胞株間，這表示以 HSVtk/GCV 策略的基因治療可以殺死同一腦瘤內不同種源的惡性細胞。

由以上裸鼠體內及培養皿中的研究結果顯示：GBM8909 細胞株雖然有最低的重組腺病毒轉導效率，但對「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒」感染及 ganciclovir 治療，其結果卻差別不大而且有相當好的效果，這表示一定有其它的因素牽涉其中。我們將 200 個經基因工程修改過的人類多形性神經膠質瘤細胞株置入 10 公分培養皿中(這表示細胞與細胞之間不會相接觸)，再使用 ganciclovir 治療，結果發現 GBM8909 細胞有最低的死亡率，其存活細胞數較 GBM8401 或 GBM8804 為多(如圖八)，這表示細胞與細胞之間相接觸對於「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒」感染及 ganciclovir 治療，有重要的影響。

## 討論

為了了解不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株，在接受攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酶的重組腺病毒及 ganciclovir 進行基因治療後的效果，有無顯著差異，以及進行基因治療時，其內部不同的細胞組成是否會影響預後，我們利用了三個在我們醫院自己純化的不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株(GBM8401、GBM8804、及 GBM8909)，同時也利用了裸鼠的動物模式來檢測這個策略是否可行。我們發現：這三個不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株(GBM8401、GBM8804、及 GBM8909)，在體外培養中有不同的腺病毒轉導效率，這似乎也表示不同的人類多形性神經膠質瘤

細胞株，對基因治療也會有不同的效果，包含有各式各樣不同基因表現型的人類多形性神經膠質瘤細胞株，對於以重組腺病毒為載體的基因治療有不同的效果。

由這個實驗可以了解，經基因工程修改過的，攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酵素的人類多形性神經膠質瘤細胞株，可以被 ganciclovir 所殺死；這也是第一個在裸鼠體內，以不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株進行「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酵素的重組腺病毒」以及 ganciclovir 基因治療的實驗。我們發現：不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株形成的腫瘤殺死及旁觀效應不只存在於同一個細胞株中，在不同的細胞株間也有相同的效果；由此可以知道「攜帶有第一型皰疹病毒胸腺嘧啶激酵素基因的重組腺病毒」在加入 ganciclovir 後，可以殺死不同種源的人類多形性神經膠質瘤。

在不同細胞株間存在有不同的重組腺病毒載體轉導效率，其機轉是什麼？至今仍不是非常清楚，最近有一些學者發現了一個科沙奇病毒—腺病毒共同接受體的存在(Coxsackievims and adenovirus receptor; CAR)，這個接受體是一個重組腺病毒載體進入細胞內的一個重要的途徑 (Bergelson et al., 1997)，而 CAR 的表現也可以大大地增加基因的傳送 (Bergelson et al., 1997; Crystal RG., 1997)。學者們認為：調控 CAR 的表現可以有效地在體內及體外，增加以重組腺病毒載體為工具的基因轉導，而細胞株若表現 integrin  $\alpha\beta 5$  (Croyle et al., 1998; Hashimoto et al., 1997; Takayama et al., 1998; Wickham et al., 1994)，也是重組腺病毒載體能否順利轉導基因到細胞內的重要因素。而我們研究的結果，在這三株人類多形性神經膠質瘤細胞株，GBM8909 細胞株其重組腺病毒轉導效率在 moi 為 500 或 500 以上最差(如圖六)，但不影響在高密度細胞培養下 moi 大於等於 1000 時的 GCV 細胞殺死效率及裸鼠動物模式之腫瘤縮小效果(如圖七)；這個原因是否由於不同細胞株間 CAR 或 integrin  $\alpha\beta 5$  含量的不同所致，仍待進一步探討。我們更進一步地研究顯示：在低密度細胞培養下(圖八)，GCV 對含有 tk 基因的 GBM8909 細胞株的細胞毒殺作用顯

著減少，我們認為在高密度細胞培養下，癌細胞被殺死的主要原因是旁觀效應，而非完全由於重組腺病毒載體轉導效率及 GCV 細胞毒殺作用。

許多學者認為介於細胞與細胞之間的 gap junction，在體內(Dilber et al., 1997)及體外(Bi et al., 1993; Shinoura et al., 1996; Elshami et al., 1996; Mesnil et al., 1996; Fick et al., 1995)的旁觀效應上扮演了非常重要的角色；gap junction 管道是介於細胞與細胞間的一種蛋白質，其最主要的構成物叫作 connexin，在星狀細胞中是 connexin 43，而寡樹突神經膠質細胞及一些神經元中則是 connexin 32 (Shinoura et al., 1996)；Phosphorylated GCV 可以通過由 connexin 構成的 gap junction channel 而不會通過細胞膜，所以由高密度與低密度細胞培養下 GBM8909 細胞株對 GCV 細胞毒殺的差異性，可以推論旁觀效應所扮演的角色。由圖七可以發現：在 moi 為 1 及 10 的時候，有一個依賴感染力大小(infectivity)來決定細胞存活率的差異。這個與依賴感染力大小而決定細胞存活率的趨勢，可以造成不同的細胞株對 GCV 產生不同的敏感性(sensitivity)；細胞株本身 connexin 43 的表現多少也會影響旁觀效應的強度 (Shinoura et al., 1996)。

多形性神經膠質瘤是一個極惡性的癌症，而且具有不同而分歧的基因表現型，不單只是不同腦瘤間的細胞有不同的基因表現型，而同一個腦瘤內不同的細胞也有不同的生物特性及基因表現；因為以 HSVtk/GCV 這個自殺基因策略是非常依靠旁觀效應，所以在不同基因表現的細胞間，其旁觀效應之大小就具有相當的重要性。前人的研究已發現：旁觀效應可以存在於共同培養的小鼠多形性神經膠質瘤細胞株及不同種類的小鼠其他癌細胞株之間 (Wu et al., 1994)，而介於小鼠多形性神經膠質瘤細胞株與人類多形性神經質瘤細胞株間之旁觀效應則不太明顯 (Shinoura et al., 1996)。學者的解釋是人與小鼠細胞株彼此接觸的程度比不上小鼠與小鼠細胞株；我們則證實了在不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株間也有旁觀效應，而且由圖十三、十四可以發現只要有 10 %含有 tk 基因的惡性腦瘤細胞株，加入 GCV 後可

以殺死接近百分之百的混合培養細胞株，所以我們認為：藉由旁觀效應，可以有效地殺死一個腫瘤內具有不同基因背景不同的惡性腦瘤細胞。

由圖九可以知道，經由以重組腺病毒載體為工具攜帶了 HSV-tk 基因，再以 GCV 注射後，在裸鼠腦內，由不同細胞株長成之腦瘤，其治療效果略有不同，但差距不大；因為不同細胞株在裸鼠腦內其生長速率不同(圖十)，所以在注射重組腺病毒時，其接觸到的細胞數目一定不同，而被感染到的癌細胞比例一定有相當的差距。如生長最慢的 GBM8909 細胞株可以形成較小的腦瘤，所以其病毒顆粒與細胞數的比例一定最大，這造成 GBM8909 細胞株對 GCV 細胞毒殺作用；而 GBM8804 細胞株與 GBM8401 細胞株相比有較慢的腫瘤生長速率，但卻有與 GBM8401 細胞株差不多的腫瘤縮小比率(圖十，82 % vs 80 %)，所以很難把所有的原因完全歸於病毒顆粒與癌細胞株數目之比例上。而本實驗所採用的這三個人類多形性神經膠質瘤細胞株對 GCV 的治療均有很好的效果，所以不同的重組腺病毒感染率並不會影響 GCV 對腫瘤毒殺效應。

本實驗中我們發現在裸鼠腦內以重組腺病毒載體為工具，攜帶有 HSV-tk 基因再施以 GCV 治療，可以達到 80-91 % 的顯著腫瘤縮小效應(如圖十)，但所有的實驗動物中，並沒有辦達到百分之百的治療效果，這個結果也在其他學者使用小裸鼠及免疫力不全的鼠類動物中被發現(Chen et al., 1994; Maron et al., 1996)；可以了解的是，一定有一些微量的癌細胞逃脫了重組腺病毒的感染及旁觀效應，而使得腫瘤治療的效果打了折扣，但長期觀察的結果發現，要完全根除腫瘤細胞，則需免疫系統的參與 (Barba et al., 1994)，在裸鼠體內缺乏細胞免疫力的事實造成了腫瘤細胞無法完全根除。

總而言之，本實驗證實了 GCV 治療可以殺死含有 HSV-tk 基因的惡性腦瘤細胞！這也是全世界第一個在體內(裸鼠腦內)以攜帶有 HSV-tk 基因的重組腺病毒對不同的人類多形性神經膠質瘤細胞株進行基因治療的研究。我們發現在同類及不同類的人

類多形性神經膠質瘤細胞株間，均有旁觀效應及腫瘤抑制的效果，這表示以「攜帶有 HSVtk 基因的重組腺病毒載體及 GCV」這個策略，有很大的潛力來進行人類的多形性神經膠質瘤治療。

## 抗血管新生策略

### 初步成果

以基因工程的方法建立會分泌 angiostatin 的細胞株，進行實驗：

#### 基因建構及表現：

利用 PCR 放大的方法，生產出可生成 angiostatin 的 cDNA (如圖二十六)，兩端具 Bam HI, Hind III 及 XbaI 共四個酵素切割處；其中在 N 端含有控制蛋白質分泌的訊號(signal sequence)、preactivation peptide (PA)、以及 plasminogen 中的 kringle 1 至 4(K1-4)區域，並在靠在 C 端的 Kringle 4 有一個來自 influenza 病毒的 HA antigenic epitope。先將 PCR 生成之 cDNA 重組到 pGEM-T 這個載體中(Promega Corp., Madison, WI, USA) (如圖二十七)，以 T7 及 SP6 這兩個引子(Promega Corp., Madison, WI, USA)進行核酸序列檢查，完全確定這一千四百多個核酸序列都正確，才加以採用。再以 Bam HI 酵素處理 mAngiostatin-HA/pGEM-T 及 pCEP4 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)這二個質體，進行轉接，最後生成 mAngiostatin -HA/pCEP4 (如圖二十八)；以 CMV 啟動子來驅動這一段可生成分泌性抑制血管新生作用蛋白質的基因序列。將 mAngiostatin-HA/pCEP4 用來轉染 C6 惡性腦瘤細胞株，再利用 Hygromycin (200 µg/ml) 進行選擇四週，再收集穩定的轉染細胞群稱為 C6/mAngiostatin-HA/pCEP4 進行實驗，另外野生型 C6 惡性腦瘤細胞株本身及以 pCEP4 表現型載體轉染；以同樣方法選擇四週稱為 C6/pCEP4 的質體進行實驗。以免疫點墨法 (Immunoblotting)，利用 12CA5 單源細胞株的條件培養液(conditioned medium)，其中內含大量的 anti-HA

抗體；不論在 C6/mAngiostatin-HA/pCEP4 細胞株中及其條件培養液(conditioned medium) 的濃縮液中均可偵測到一個 58 kDa 大小的蛋白質，但在 C6 及 C6/pCEP4 細胞株中則偵測不到（如圖二十九）；而偵測出 58 kDa 蛋白質其分子量比原來 angiostatin 的 38 kDa 要大的原因，是因為我們設計的基因結構除了原有的 angiostatin 外，還加上了 preactivation peptide 及 HA 的附加標籤（tag），所以生成的蛋白質較大（Cap et al., 1998）。

所生成的三個穩定的細胞株以「材料及方法」中的方法進行生長速率的測定，結果發現 C6、C6/pCEP4、及 C6/mAngiostatin-HA/pCEP4 細胞株的生長速率差別不大（如圖三十）。

利用「材料及方法」中的方法建立人類臍靜脈內皮細胞的初培養，並另行購買了 ATCC 的 ECV403 細胞一起進行實驗。我們發現：含有 angiostatin 的條件培養液(conditioned medium)，可以使臍靜脈內皮細胞的增生受到抑制（如圖三十一）。

#### 抑制原發性腫瘤生長：

將穩定的、基因工程修改過的細胞株，按「材料及方法」的方法植入 Wistar rat 左側基底核中，共計 15 隻（分成 C6、C6/pCEP4、C6/mAngiostatin-HA/pCEP4 三組，每組 5 隻）。我們發現：會分泌 angiostatin 的細胞株，其腫瘤大小較 C6/pCEP4 及 C6 明顯變小（以植入放七天計算腫瘤體積為  $31.37\text{mm}^3$  :  $128.44\text{mm}^3$  減少 75%以上；如圖三十二）；而不會分泌 angiostatin 的細胞株的 Wistar rat，其腦瘤生長迅速（二週可達  $500\text{mm}^3$  以上）且存活不到三週。此外會分泌 angiostatin 的細胞株形成的腦瘤，其腫瘤大小始終相差不大，而且 Wistar rat 可以存活超過三個月以上；而會分泌 angiostatin 的細胞株與不會分泌 angiostatin 的野生型 C6 惡性腦瘤細胞以 1 : 1 先混合好，再注入鼠腦內，也

發現有相類似結果（如圖三十三）。以 H & E stain 染未經心內灌注，而且是新鮮取下，再冷凍切片的標本，發現在 C6 惡性腦瘤中血管大大小小密密麻麻；而會分泌 angiostatin 細胞株（C6/mAngiostatin-HA/pCEP4）形成的腦瘤則找不到什麼明顯的血管結構（如圖三十三）。

建立攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒：

基因建構、生產攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒及基因表現：

利用 PCR 放大的方法，生產出可以生成 angiostatin 的 cDNA（如圖三十四）；兩端有二個 Not I 酵素切割處，其中在 N 端含有控制蛋白質分泌的訊號（signal sequence）、preactivation peptide (PA)、以及 plasminogen 中的 kringle 1 至 4 (K1~4) 區域，並在靠在 C 端的 Kringle 4 有一個來 influenza 病毒的 HA antigenic epitope。先將 PCR 生成之 cDNA 重組到 pGEM-T 這個載體中 (Promega Corp., Madison, WI, USA)（如圖三十五），以 T7 及 SP6 這二個引子 (Promega Corp., Madison, WI, USA) 進行核酸序列檢查，完全確定這一千四百多個核酸序都正確，才加以採用。再利用 Not I 酵素處理 mAngiostatin-HA-N/pGEM-T 及 PXX-Uf1 這二個質體，進行轉接，最後生成 PXX-mAngiostatin-HA（如圖三十六）；以 CMV 啟動子來區動這一段可生成分泌性、及抑制血管新生蛋白質的基因序列。按照「材料及方法」中的方法，生產出重組腺相關病毒，以 Slot blot 分析法測定出生產出的重組腺相關病毒其價效已達  $10^{11}$  viral particles/ml 以上（如圖三十八），足敷動物實驗所需。以攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒載體感染 C6 惡性腦瘤細胞株，以免疫點墨法 (Immunoblotting) 利用 12CA5 單源細胞株的條件培養液 (conditioned medium)；內含大量的 anti-HA 抗體；可以偵測到一個約 70~80 kDa 的蛋白質（如圖三十七），但在以野生型 C6 細胞株及以攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒感染的 C6 細胞株則偵測不到，而偵測到 70~80 kDa 的蛋白質比原來 angiostatin 38 kDa 要大的多的原因是因為鼠的 angiostatin 分子量本來就比人的要大（因為增加了 preactivation peptide; HA tag）另外

在鼠的 angiostatin 中有二個糖化部位 (glycosylation sites) 而在人的 angiostatin 中只有一個糖化部位 (glycosylation sites) 的原因 (Tanaka et al., 1998)。

利用「材料及方法」中的方法建立了人類臍靜脈內皮細胞的初培養(primary culture)，並另行購買了 ATCC 的 ECV403 細胞進行實驗，將攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒、攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒分別感染人類臍靜脈內皮細胞，結果發現三者之間的生長速率沒有什麼太大差別(如圖三十九)；這表示可能以重組腺相關病毒載體進行基因傳送，在某些細胞效率是很差的，也就是說重組腺相關病毒不每一種細胞都進的去。這個發現讓我們有了更進一步實驗來加以探討。

#### 對腫瘤生長的效應：

依據圖二十四的治療方式，我們發現以攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒載體來治療，確實可以達到「抑制」腫瘤形成的結果，癌細胞及攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒載體同時植入 Wistar rat 左腦基底核中，注射後七天，腦瘤形成的體積就有所不同；到注射後十天，二者腫瘤體積接近，但隨著時間的延續二者之差別又逐漸拉大(如圖四十)。在圖四十一中可以看到，注射癌細胞及攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒載體後七天及十四天腦瘤的體積差別非常明顯。

依據圖二十五的治療方式，我們發現以攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒載體來植入已存在的腦瘤當中 (intratumoral injection)，確實可以達到「縮小」腫瘤的結果，先將癌細胞植入 Wistar rat 左側基底核中，待腫瘤已長到相當體積，再將攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒載體注射到腫瘤內及附近(在一個管道 (tract) 中共注射六個點)，到了癌細胞注射後 10 天(病毒載體

注射後三天)，腫瘤體積仍持續長大；但到了 10 天以後，腫瘤的體積即逐漸縮小；到了第 15 天時，腦瘤體積甚至比注射癌細胞後 7 天的體積還要小（即注射攜帶有 angiostatin 的重組腺病毒載體可以將腫瘤「縮小」到比注射前還小的程度（如圖四十二）。在圖四十三中可以看到，注射後的腫瘤體積變化非常明顯。如圖四十四，可以發現未經心內灌注，直取腦切片進行 H & E 染色的標本，也發現未注射攜帶有 angiostatin 重組腺相關病毒載體的標本，其腫瘤內部血管大大小小密密麻麻，而注射了該項載體後，則幾乎找不到什麼明顯的血管結構。

## 合併療法(Combined therapy)

### 初步成果

以攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺病毒、重組腺相關病毒、及合併使用攜帶有 thymidine kinase 自殺基因的重組腺病毒在體內及體外對不同細胞株的轉導效率：

將  $5 \times 10^5$  個不同種類的細胞株（C6、GBM8401、GBM8909、UVEC、及 293 細胞株）分別在 moi 1000 的情況下，進行不同載體之轉導實驗：

第一組是利用攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺病毒載體進行轉導。

第二組是利用攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒載體進行轉導。

第三組是利用攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺病毒載體（moi 1000），再加上攜帶有 thymidine kinase 自殺基因的重組腺病毒載體（moi 1000）進行轉導。

由圖四十五、四十六可以發現：不同的細胞株，在不同的情況下，轉導效率的差別極大，以 C6、GBM8401、及 GBM8909 而論，第一組以攜帶有 LacZ 報告基因的腺病毒載體進行轉導時，藍色細胞的比例最高；以攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒載體進行轉導時，其藍色細胞的比例最低，甚至低於 3% 以下，但是一旦加

入攜帶有 thymidine kinase 自殺基因的重組腺病毒載體後，則轉導效率大幅上昇一倍以上（可以到達 6 %以上）。以 293 細胞而論，以攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺病毒載體進行轉導時，其藍色細胞的比例可達 90 %以上；但是以攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒載體進行轉導時，其藍色細胞的比例僅有 20 %左右；一旦加上了攜帶有 thymidine kinase 自殺基因的重組腺病毒載體後，則藍色細胞的比例也跳昇至 90 %以上，差別非常明顯。以人類臍靜脈內皮細胞（UVEC）而論，它對重組腺病毒載體的轉導效率接近百分之百，但在重組腺相關病毒載體轉導後，幾乎找不到藍細胞(< 1 %)，這也解釋了為什麼以攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒載體對臍靜脈內皮細胞進行轉導，不能有效地抑制臍靜脈內皮細胞增生 (proliferation) 的原因；但是一旦加上了攜帶有 thymidine kinase 自殺基因的重組腺病毒載體後，則藍色細胞的比例也跳昇至 10 %以上，差別非常明顯。所以重組腺病毒載的存在，在細胞培養中是可以有效地增加重組腺相關病毒載體的轉導效率的。

在動物模式方面則仿照「材料與方法」中的「抑制效果」(inhibitory effect) 及「縮小效果」(shrinkage effect) 模式中，將攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒、及攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺病毒，依以下方式注射至 Wistar rat 中：

第一組：(對照組)只有 C6 惡性腦瘤細胞，而不注射任何病毒載體；結果在基底核切面中組織 X-gal 染色顯示：在腫瘤範圍內沒有任何藍色的細胞，而在脈絡叢中有 1~2/HPF 個藍色細胞，血管內皮中 0~1/HPF 個藍色細胞。

第二組：仿照「抑制效果」模式 (inhibitory effect)，將攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒與 C6 惡性腦瘤細胞株同時注射；10 天後再以 1 x PBS 及 4% formalin 進行心內灌注，取腦切片染 X-gal；結果在基底核切面中，發現在腫瘤範圍內，有平均散佈的藍色細胞 10~20/HPF，在脈絡叢內有 3~5/HPF 個藍色細胞，在血管內皮中 1~2/HPF 個藍色細胞。

第三組：仿照「縮小效果」模式 (shrinkage effect)，先將 C6 惡性腦瘤細胞植入 Wistar rat 腦內，七天後再注射攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒；三天後以 1 X PBS 及 4% formalin 進行心內灌注，取腦切片染 X-gal；結果在基底核切面中，發現在腫瘤範圍內有平均散佈的藍色細胞 (25~30/HPF)，在脈絡叢內有 5/HPF 個藍色細胞，血管內皮中有 2/HPF 個藍色細胞。

第四組：合併療法，將 C6 惡性腦瘤細胞株與攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒載體、及攜帶有 thymidine kinase 自殺基因的重組腺相關病毒一起注射至 Wistar rat 左側基底核中；十天後再以 1 x PBS 及 4% formalin 進行心內灌注，取腦，切片染 X-gal；結果在基底核切面中，發現腫瘤範圍內有平均散佈的藍色細胞 (25~30/HPF)，在脈絡叢中有 5/HPF 個藍色細胞，在血管內皮中有 2/HPF 個藍色細胞。與第二組相比，在腫瘤範圍內的藍色細胞比例增加了三倍 (10/HPF to 30/HPF)。

第五組 (如圖四十七)：則是合併療法，先將 C6 惡性腦瘤細胞株植入 Wistar rat 腦內，七天後再注射攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒載體與攜帶有 thymidine kinase 自殺基因的重組腺相關病毒載體，三天後以 1 x PBS 及 4% formalin 進行心內灌注，取腦切片染 X-gal；結果在基底核切面中，發現肉眼即可看到的整個腫瘤的範圍內均呈現藍色，而高倍鏡下則幾乎所有的細胞都是藍色的，而脈絡叢中也幾乎是藍色的，血管內皮中也有 1~2/HPF 個藍色細胞。與第三組相比，在腫瘤範圍內的藍色細胞比例增加了相當大的比例 (由 30/HPF 到肉眼清晰可辨)。

所以我們發現，不論在體外 (in vitro) 或體內 (in vivo)，只要有重組腺病毒載體的參與，都可以大幅增加攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒載體的轉導效率；在肝細胞中也有類似發現 (Xiao X, 1997)。所以在實際應用上，選擇以攜帶

有 thymidine kinase 自殺基因的重組腺相關病毒載體與攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒載體一起使用，是有很好的相乘效果的。

## 圖表及說明

自殺基因(suicide genes) 基因療法：

(實驗設計及方法)

01. Nude rat & operation pictures.

02. Protocol for operation and ganciclovir(GCV) treatment.

03. Spy therapy.

04. Tk/pCEP4.

(初步結果)

05. Growth curve of GBM8401、GBM8804、and GBM8909 cell lines.

三株人類多形性神經膠質瘤細胞株生長速率。將 GBM8401、GBM8804、及 GBM8909 細胞株  $1 \times 10^5$  個植入 10 公分直徑的培養皿，每隔二天計算細胞的數目。

06. Transduction efficiency of AdCMVLacZ

重組腺病毒對人類多形性神經膠質瘤細胞株的轉導效率。以 AdCMVlzcZ 在不同的 moi (0、10、50、100、500、及 1000) 感染 GBM8401、8804、及 8909 細胞株，36 小時後將細胞株固定再進行 X-gal 染色，以染成藍色的細胞佔所有細胞的百分比作為轉導效率，數據表示為平均值±標準差，而且至少有三組結果以 one-way ANOVA test 加以分析( $p < 0.05$ )。

07. Therapeutic effect of AdRSVtk in high cellular density.

在高密度細胞培養下以 AdRSVtk 感染 GBM 細胞株再進行 GCV 治療。將  $1 \times 10^5$  個 GBM8401、GBM8804、及 GBM8909 細胞株以不同的 moi (0、1、10、100、及 1000)

的 AdRSVtk 進行感染，24 小時後再以 10  $\mu$ M GCV 或 PBS 加以治療，每三天換一次培養液及維持 GCV 濃度，10 天後以血球計數器計算殘存細胞的數目，細胞存活率表示為：以 GCV 治後之殘存細胞數除上以 PBS 治療後之殘存細胞數；再乘上百分之百。數據表示為平均值 $\pm$ 標準差，而且至少有三組結果以 one-way ANOVA test 加以分析( $P < 0.05$ )。

#### 08. Therapeutic effect of AdRSVtk in low cellular density.

在低密度細胞培養下，先以 AdRSVtk 感染，再施以 GCV 治療後觀察 GBM 細胞株的敏感度。先以 moi 1000 的 AdRSVtk 感染 GBM 細胞株，再 trypsinized 下來計算 200 個細胞，放入直徑 10 公分的培養皿中，加入 10  $\mu$ M 濃度的 GCV 10 天後，以 crystal violet 染色計算細胞群的數目(每一群細胞至少 50 個以上才算數)，每組至少三組數據，且表示為平均值 $\pm$ 標準差。

#### 09. Tumor size between treatment and non-treatment group.

在裸鼠動物模式中先以 AdRSVtk 感染，再施以 GCV 治療，可以抑制人類多形性神經膠質瘤的生長。圖片是以 GBM8401 細胞株注射到裸鼠腦內，7 天後再分組，分別注射 AdRSVtk，並後續以 PBS 或 GCV (15 mg/kg 一天二次，共 10 天)的結果，治療結束後 7 天裸鼠先進行心內灌注，再取腦切片，以 Hematoxylin/Eosin 染色。

#### 10. Tumor shrinkage percentage.

在裸鼠動物模式中先建立腦瘤再加上 AdRSVtk 感染再施以 GCV 治療的結果。

#### 11. Transduction efficiency in tissue by AdCMVLacZ and apoptosis.

攜帶有 lacZ 基因的重組腺病毒對惡性腦瘤的轉倒效率極佳，而且造成腦瘤

縮小的機轉是透過細胞凋亡(apoptosis)的途徑，由 TUNEL 染色可以證實。

12. Bystander effect: GBM8401/tk to GBM8401.

在體外共同培養來觀察旁觀效應。總共  $4 \times 10^5$  個細胞，以不同比例的二組細胞株，在直徑 3.5 公分的培養皿中進行共同培養：以經基因工程修改過的 GBM8401 細胞(GBM8401/tk)與原始型 GBM8401 細胞，在同一個 10cm 培養皿中共同培養，並加入 ganciclovir 10  $\mu$ M 治療十天後，以 trypsin 將細胞分離下來，計算細胞數目。

13. Bystander effect: GBM8401/tk to GBM8909.

在體外共同培養來觀察旁觀效應。總共  $4 \times 10^5$  個細胞，以不同比例的二組細胞株，在直徑 3.5 公分的培養皿中進行共同培養：以經基因工程修改過的 GBM8401 細胞(GBM8401/tk)與原始型 GBM8909 細胞，在同一個 10cm 培養皿中共同培養，並加入 ganciclovir 10  $\mu$ M 治療十天後，以 trypsin 將細胞分離下來，計算細胞數目。

14. Bystander effect: GBM8909/tk to GBM8401.

在體外共同培養來觀察旁觀效應。總共  $4 \times 10^5$  個細胞，以不同比例的二組細胞株在直徑 3.5 公分的培養皿中進行共同培養：以經基因工程修改過的 GBM8909 細胞(GBM8909/tk)與原始型 GBM8401 細胞，在同一個 10 cm 培養皿中共同培養，並加入 ganciclovir 10  $\mu$ M 治療十天後，以 trypsin 將細胞分離下來，計算細胞數目。

15. Bystander effect: GBM8909/tk to GBM8909.

在體外共同培養來觀察旁觀效應。總共  $4 \times 10^5$  個細胞，以不同比例的二組細胞株，在直徑 3.5 公分的培養皿中進行共同培養：以經基因工程修改過的

GBM8909 細胞(GBM8909/tk)與原始型 GBM8909 細胞，在同一個 10 cm 培養皿中共同培養，並加入 ganciclovir 10  $\mu$ M 治療十天後，以 trypsin 將細胞分離下來，計算細胞數目。

### 抑制血管內皮新生的基因療法

#### (實驗設計及方法)

16. Angiostatin & plasminogen cartoon figure.
17. Genetically-modified cell-targeted antiangiogenic gene therapy strategy.
18. Gene structure of mAngiostatin-HA/pCEP4.
19. AAV-targeted antiangiogenic gene therapy strategy.
20. Gene structure of pXX-mAngiostatin-HA.
21. Methods for the generation of recombinant AAV vector.
22. Gene structure of pXX-2 and pXX-6.
23. Human umbilical cord & UVEC.
24. Protocol for the inhibitory effect of AAV-mAngiostatin-HA.
25. Protocol for the shrinkage effect of AAV-mAngiostatin-HA.

#### (初步成果)

26. PCR result: mAngiostatin-HA.

Angiostatin 的 cDNA；兩端具 Bam HI, Hind III 及 XbaI 共四個酵素切割處；其中在 N 端含有控制蛋白質分泌的訊號 (signal sequence)、preactivation peptide (PA)、以及 plasminogen 中的 kringle 1 至 4 (K1~4) 區域，並在靠在 C 端的 Kringle 4 有一個來自 influenza 病毒的 HA antigenic epitope

27. mAngiostatin-HA/pGEM-T

先將 PCR 生成之 cDNA 重組到 pGEM-T 這個載體中 (Promega Corp., Madison, WI, USA)，以 T7 及 SP6 這兩個引子 (Promega Corp., Madison, WI, USA) 進行核

酸序列檢查，完全確定這一千四百多個核酸序列都正確，才加以採用。

#### 28. mAngiostatin/pCEP4.

以 Bam HI 酵素處理 mAngiostatin-HA/pGEM-T 及 pCEP4 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) 這二個質體，進行轉接，最後生成 mAngiostatin-HA/pCEP4。以 CMV 啟動子來驅動這一段可生成分泌性及抑制血管新生作用蛋白質的基因序列。

#### 29. IP for angiostatin in C6/mAngiostatin-HA/pCEP4.

以免疫點墨法 (Immunoblotting) 利用 12CA5 單源細胞株的條件培養液 (conditioned medium)。內含大量的 anti-HA 抗體；不論在 C6/mAngiostatin-HA/pCEP4 細胞株中及其條件培養液 (conditioned medium) 的濃縮液中，均可偵測到一個 58 kDa 大小的蛋白質，但在 C6 及 C6/pCEP4 細胞株中，則偵測不到；而偵測出 58 kDa 蛋白質分子量比原來 angiostatin 的 38 kDa 要大的原因，是因為我們設計的基因結構除了原有的 angiostatin 外，還加上了 preactivation peptide 及 HA 的附加標籤 (tag)，所以生成的蛋白質較大 (Cap et al., 1998)。

#### 30. Growth curve of C6, C6/pCEP4, C6/mAngiostatin-HA/pCEP4.

所生成的三個穩定的細胞株以「材料及方法」中的方法進行生長速度的測定，結果發現 C6, C6/pCEP4 及 C6/mAngiostatin-HA/pCEP4 細胞株生長速率差別不大。

#### 31. Inhibition of HUVC proliferation by conditioned medium which containing the angiostatin.

利用「材料及方法」中的方法建立人類臍靜脈內皮細胞的初培養進行實驗。

我們發現：含有 angiostatin 的條件培養液(conditioned medium)可以使臍靜脈內皮細胞的增生受到抑制。

### 32. Tumor size: C6/pCEP4 : C6/mAngiostatin-HA/pCEP4.

會分泌 angiostatin 的細胞，其腫瘤大小較 C6/pCEP4 及 C6 明顯變小（以植入後七天，計算腫瘤體積為  $31.37\text{mm}^3$  :  $128.44\text{mm}^3$ ，減少了 75 % 以上。

### 33. H&E stain for Tumor size: C6/pCEP4 : C6/mAngiostatin-HA/pCEP4.

會分泌 angiostatin 的細胞株與不會分泌 angiostatin 的野生型 C6 惡性腦瘤細胞株以 1 : 1 先混合好，再注入鼠腦內，也會有相類似結果。以 H & E stain 染未經心內灌注，而且是新鮮取下，再冷凍切片的標本，發現在 C6 惡性腦瘤中，血管大大小小、密密麻麻，而會分泌 angiostatin 的細胞株（C6/mAngiostatin-HA/pCEP4）形成的腦瘤則找不到什麼明顯血管結構。

### 34. PCR results: mAngiostatin-HA-N.

Angiostatin 的 cDNA 兩端有二個 Not I 酵素切割處，其中在 N 端含有控制蛋白質分泌的訊號（signal sequence）、preactivation peptide (PA)、以及 plasminogen 中的 kringle 1 至 4 (K1~4) 區域，並在靠在 C 端的 Kringle 4 有一個來自 influenza 病毒的 HA antigenic epitope。

### 35. mAngiostatin-HA-N/pGEM-T.

將 PCR 生成之 cDNA 重組到 pGEM-T 這個載體中 (Promega Corp., Madison, WI, USA)，以 T7 及 SP6 這二個引子 (Promega Corp., Madison, WI, USA) 進行核酸序列檢查，完全確定這一千四百多個核酸序都正確，才加以採用。

### 36. pXX-mAngiostatin-HA.

再利用 Not I 酵素處理 mAngiostatin-HA-N/pGEM-T 及 PXX-UF1 這二個質體，進行轉接，最後生成 PXX-mAngiostatin-HA。以 CMV 啟動子來區動這一段可生成分泌性、及抑制血管新生蛋白質的基因序列。

### 37. IP for angiostatin in C6 + AAV-mAngiostatin-HA.

以攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒載體感染 C6 惡性腦瘤細胞株，以免疫點墨法 (Immunoblotting) 利用 12CA5 單源細胞株的條件培養液 (conditioned medium)。其中內含大量的 anti-HA 抗體，可以偵測到一個約 70~80 kDa 的蛋白質，但在野生型 C6 細胞株及以攜帶有 Lac Z 報告基因的重組腺相關病毒感染的 C6 細胞株則偵測不到；而偵測到 70~80 kDa 的蛋白質比原來 angiostatin 38 kDa 要大的多的原因是因為鼠的 angiostatin 分子量本來就比人的要大(因為增加了 preactivation peptide; HA tag)另外在鼠的 angiostatin 中有二個糖化部位 (glycosylation sites)，而在人的 angiostatin 中只有一個糖化部位 (glycosylation sites) 的原因 (Tanaka et al., 1998)。

### 38. Slot blot assay for titer of AAV-mAngiostatin-HA.

生產出重組腺相關病毒，以 Slot blot 分析法測定出生產出的重組腺相關病毒其價效已達  $10^{11}$  viral particles/ml 以上，足敷動物實驗所需。

### 39. Inhibition of HUVC proliferation by AAV-mAngiostatin-HA.

利用「材料及方法」中的方法建立了人類臍靜脈內皮細胞的初培養進行實驗，將攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒、攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒，分別感染人類臍靜脈內皮細胞，結果發現三者之間的生長速率沒有什麼太大差別，這表示以重組腺相關病毒載體進行基因傳送，在某些細胞其效率是很差的；也就是說重組腺相關病毒不是每一種細胞都進的去。這個發現讓我們有了更進一步實驗來加以探討。

#### 40. Tumor size in inhibitory effect group (1).

依據圖三十一的治療方式，我們發現以攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒載體來治療，確實可以達到「抑制」腫瘤形成的結果，癌細胞及攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒載體同時植入 Wistar rat 左腦基底核中，注射後七天，腦瘤形成的體積就有所不同，到注射後十天，二者腫瘤體積接近但隨著時間的延續二者之差別又逐漸拉大。

#### 41. Tumor size in inhibitory effect group (2).

注射癌細胞及攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒載體後七天及十四天腦瘤的體積差別非常明顯。

#### 42. Tumor size in shrinkage effect group (1).

依據圖三十二的治療方式，我們發現，以攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒載體來植入已存在的腦瘤當中 (intratumoral injection)，確實可以達到「縮小」腫瘤的結果，先將癌細胞植入 Wistar rat 左側基底核中，待腫瘤已長到相當的體積後，再將攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒載體注射到腫瘤內部及附近 (在一個注射管道 (tract) 中共注射六個點)，到了癌細胞注射後 10 天 (病毒載體注射後三天)，腫瘤體積仍持續長大，但到了 10 天以後，腫瘤的體積即逐漸縮小，到了第 15 天，甚至比注射癌細胞後 7 天的體積還要小；即注射攜帶有 angiostatin 的重組腺病毒載體可以將腫瘤「縮小」到比注射前還小的程度。

#### 43. Tumor size in shrinkage effect group (2).

注射癌細胞七天及十四天後，腦瘤的體積差別非常明顯。

#### 44. Angiostatin effect in tumor.

注射癌細胞後十四天，腦瘤的體積差別非常明顯。也可以發現未經心內灌注，直取腦切片進行 H & E 染色的標本中，未注射攜帶有 angiostatin 重組腺相關病毒載體的標本，其腫瘤內部血管大大小小、密密麻麻，而注射了該項載體後，則幾乎找不到什麼明顯的血管結構。

#### 合併療法(Combined therapy)

(初步成果)

#### 45. X-gal staining among different cell lines (GBM8401, GBM8909, C6 cells) with AdCMVLacZ alone, AAVLacZ alone, and AdRSVtk + AAVLacZ in vitro.

將  $5 \times 10^5$  個不同種類的細胞株 (C6、GBM8401、及 GBM8909 細胞株) 分別以 moi 1000 的情況下，進行不同載體之轉導實驗：第一組是利用攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺病毒載體進行轉導；第二組是利用攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒載體進行轉導；第三組是利用攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺病毒載體 (moi 1000)，再加上攜帶有 thymidine kinase 自殺基因的重組腺病毒載體 (moi 1000) 進行轉導。可以發現：不同的細胞株，在不同的情況下，轉導效率的差別極大，以 C6、GBM8401、及 GBM 8909 細胞株而論，第一組以攜帶有 LacZ 報告基因的腺病毒載體進行轉導時，藍色細胞的比例最高；以攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒載體進行轉導，其藍色細胞的比例最低，甚至低於 3 % 以下；但是一旦有攜帶有 thymidine kinase 自殺基因的重組腺病毒載體後，則轉導效率大幅上昇一倍以上 (可以到達 6 % 以上)。所以重組腺病毒載體的存在，在細胞培養中，是可以有效地增加重組腺相關病毒載體之轉導效率的。

#### 46. X-gal staining among different cell lines (293, HUVE cells) with AdCMVLacZ alone, AAVLacZ alone, and AdRSVtk + AAVLacZ in vitro .

將  $5 \times 10^5$  個不同種類的細胞株 (293 細胞株，UVEC) 分別在 moi 1000 的

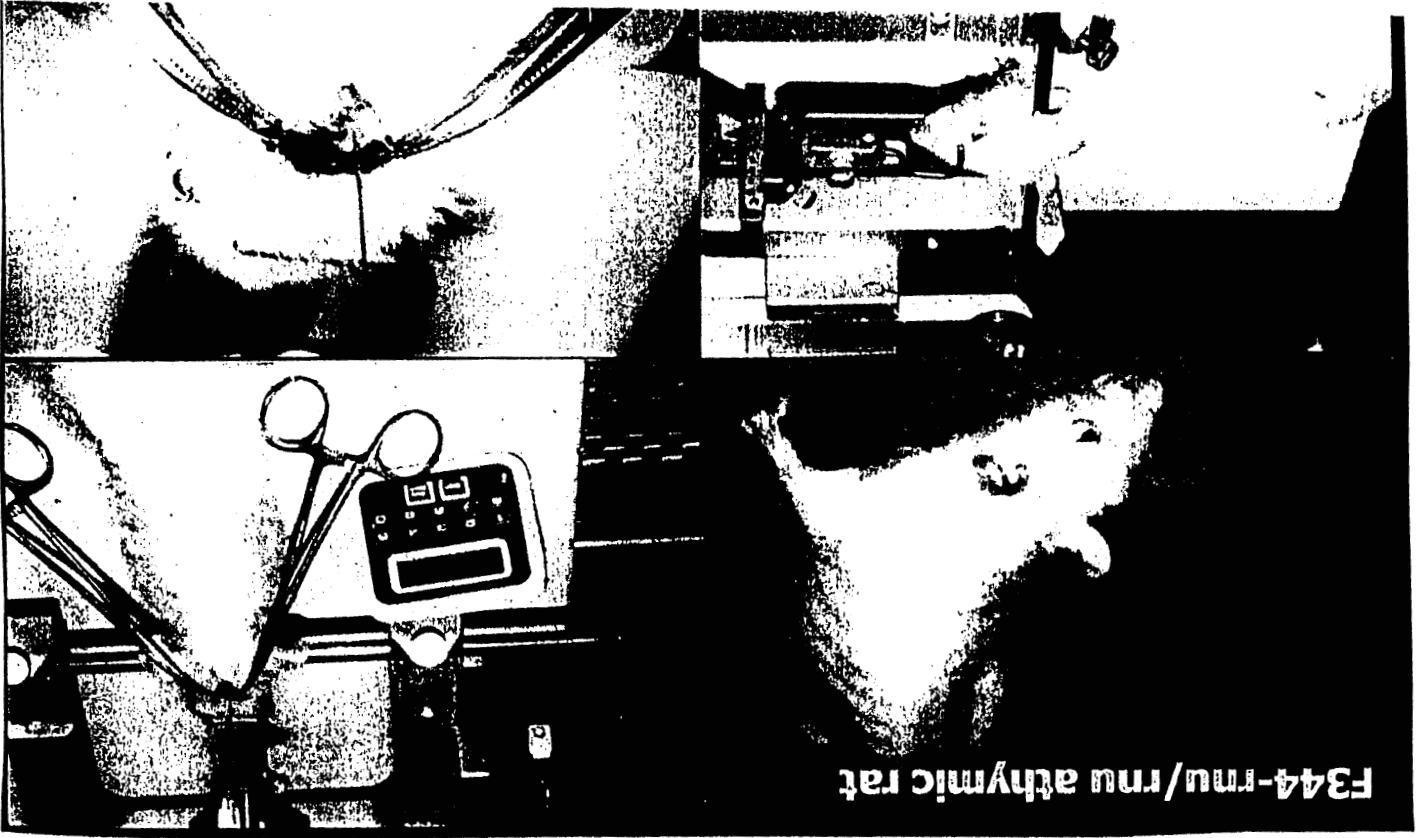
情況下，進行不同載體之轉導實驗：第一組是利用攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺病毒載體進行轉導；第二組是利用攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒載體進行轉導；第三組是利用攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺病毒載體 (moi 1000) 再加上攜帶有 thymidine kinase 自殺基因的重組腺病毒載體 (moi 1000) 進行轉導。可以發現：不同的細胞株，在不同的情況下，轉導效率的差別極大，以 293 細胞而論，以攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺病毒載體進行轉導，其藍色細胞的比例可達 90 % 以上，但是以攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒載體進行轉導，其藍色細胞的比例僅有 20 % 左右；但是一旦加上了攜帶有 thymidine kinase 自殺基因的重組腺病毒載體後，則藍色細胞的比例也跳升至 90 % 以上，差別非常明顯。以人類臍靜脈內皮細胞 (UVEC) 而論，它對重組腺病毒載體的轉導效率接近百分之百，但在重組腺相關病毒載體轉導後，幾乎找不到藍色細胞 (< 1 %)，這也解釋了為什麼以攜帶有 angiostatin 的重組腺相關病毒載體對臍靜脈內皮細胞進行轉導，不能有效地抑制臍靜脈內皮細胞增生 (proliferation) 的原因；但是一旦加上了攜帶有 thymidine kinase 自殺基因的重組腺病毒載體後，則藍色細胞的比例也跳升至 10 % 以上，差別非常明顯。所以重組腺病毒載體的存在，在細胞培養中，是可以有效地增加重組腺相關病毒載體之轉導效率的。

#### 47. X-gal staining in C6 glioma (wistar rat) with AdRSVtk + AAVLacZ.

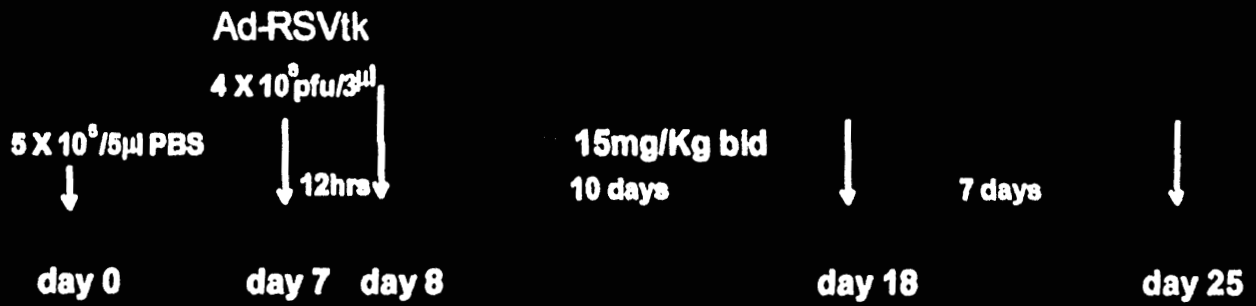
在動物模式中則仿照「材料與方法」中的「抑制效果」(inhibitory effect)，將攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒、及攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺病毒，注射至 Wistar rat 中：

第五組(合併療法)：先將 C6 惡性腦瘤細胞株植入 Wistar rat 腦內，七天後再注射攜帶有 LacZ 報告基因的重組腺相關病毒載體與攜帶有 thymidine

kinase 自殺基因的重組腺相關病毒載體，三天後以 1 x PBS 及 4% formalin 進行心內灌注，取腦切片染 X-gal，結果在基底核切面中，發現肉眼即可看到的整個腫瘤的範圍內，均呈現藍色，而高倍鏡下則幾乎所有的細胞都是藍色的，而脈絡叢中也幾乎是藍色的，血管內皮中也有 1~2/HPF 個藍色細胞；與第三組相比，在腫瘤範圍內的藍細胞比例增加了相當大的比例（由 30/HPF 到肉眼可辨）。

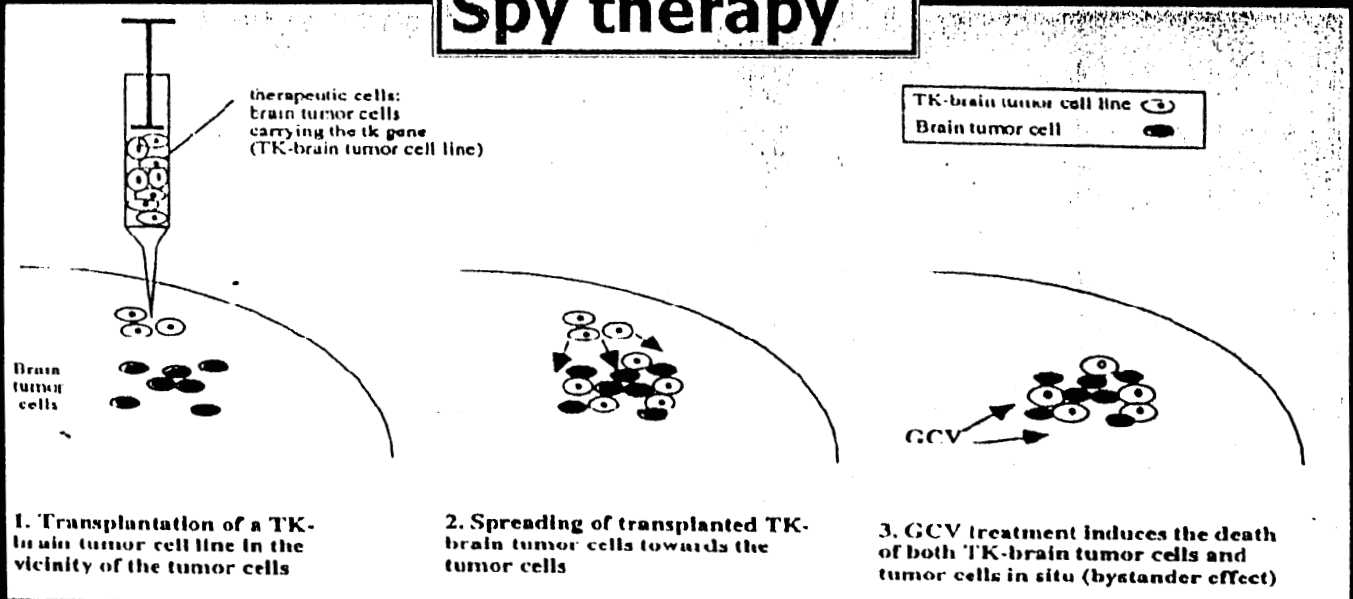


## Protocol for operation and GCV treatment:



# Bystander Effect-Mediated Therapy of Experimental Brain Tumor by Genetically Engineered Tumor Cells

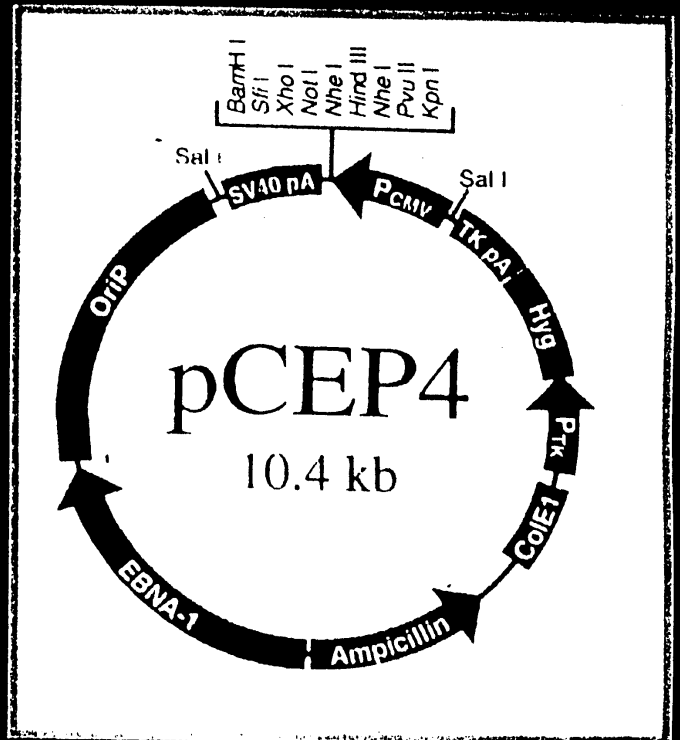
## Spy therapy

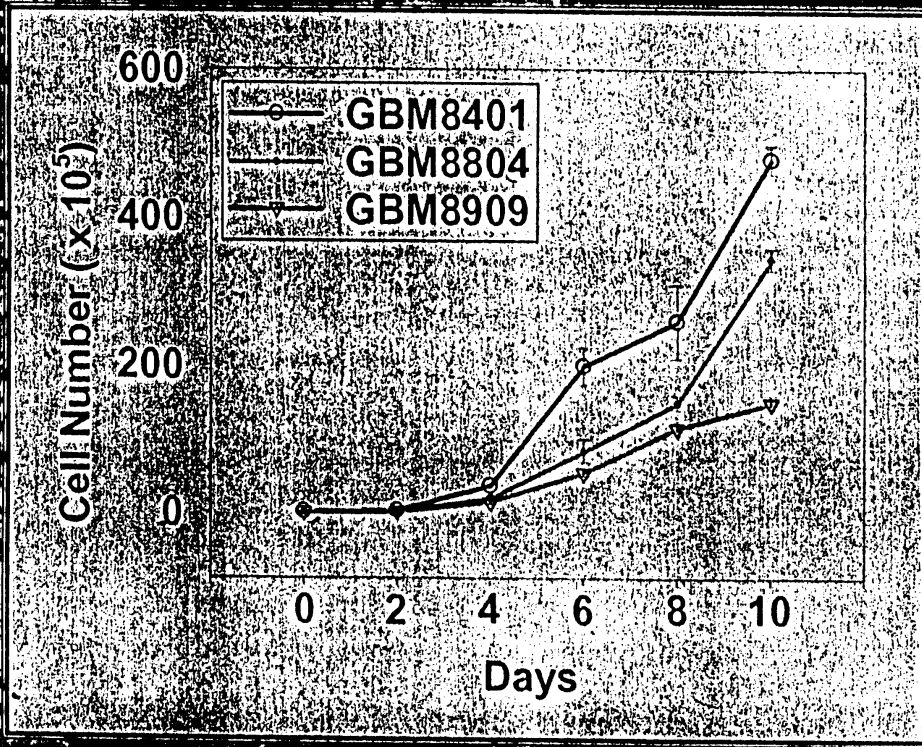


# tk/pCEP4

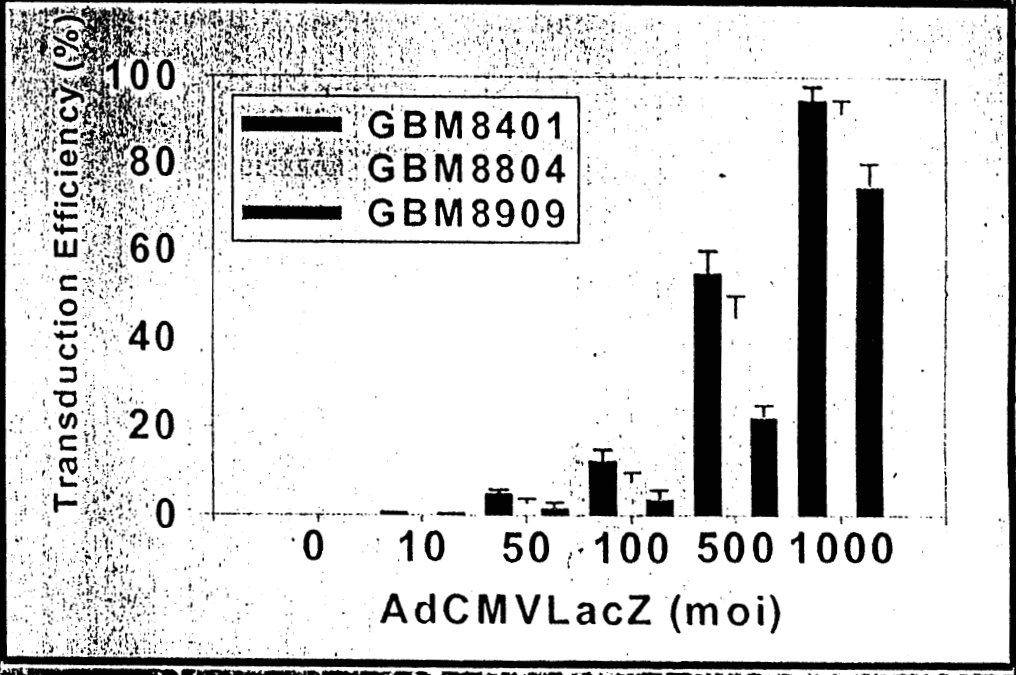
CaPO<sub>4</sub> transfection

Hygromycin selection



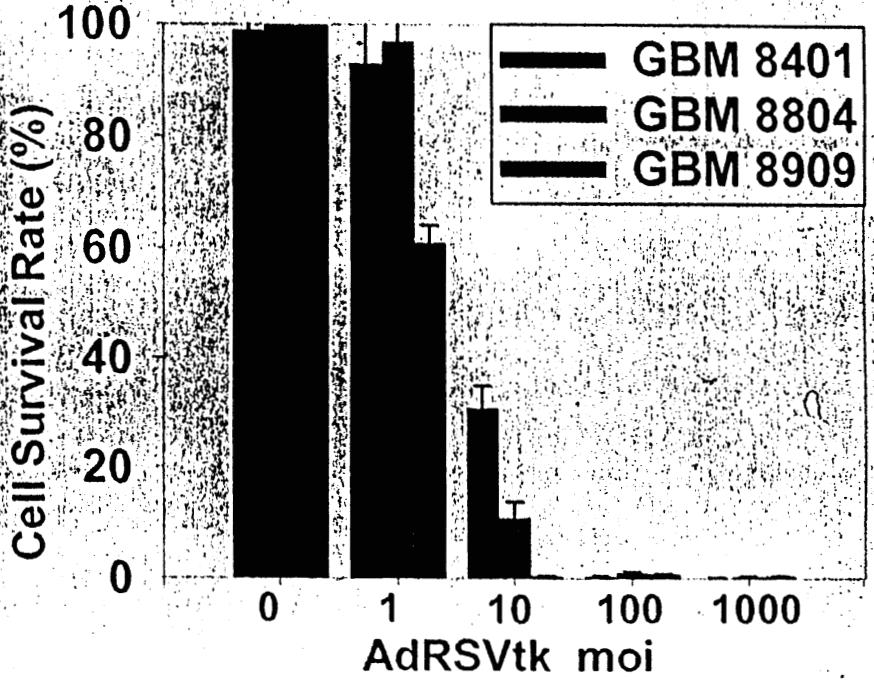


五圖



$1 \times 10^5$  / [10]

GCV: 10  $\mu$ M for 10 days



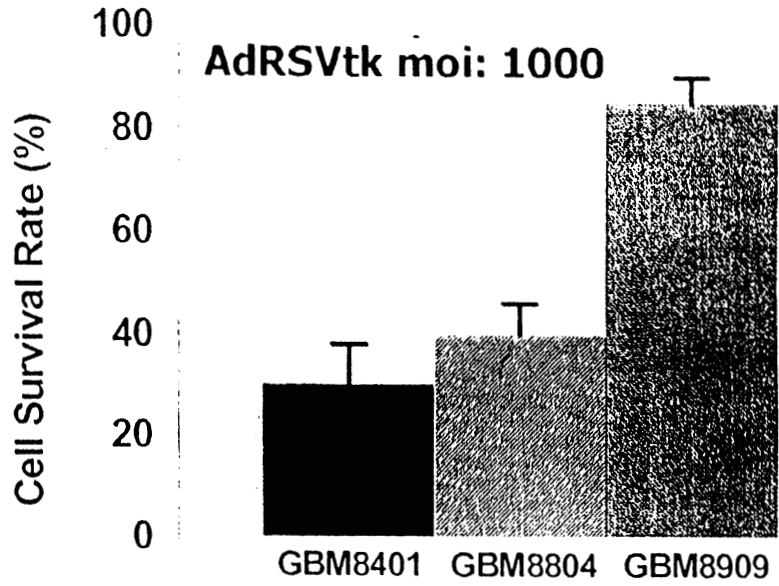
GBM8401

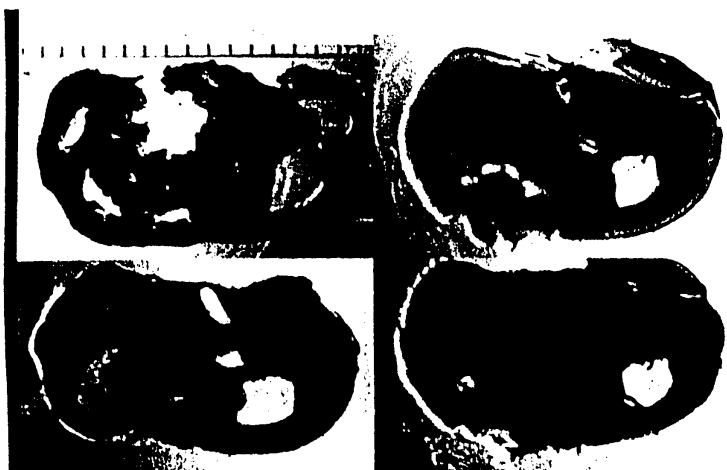
200 / [10]

GCV: 10  $\mu$ M for 10 days

GBM8804

GBM8909

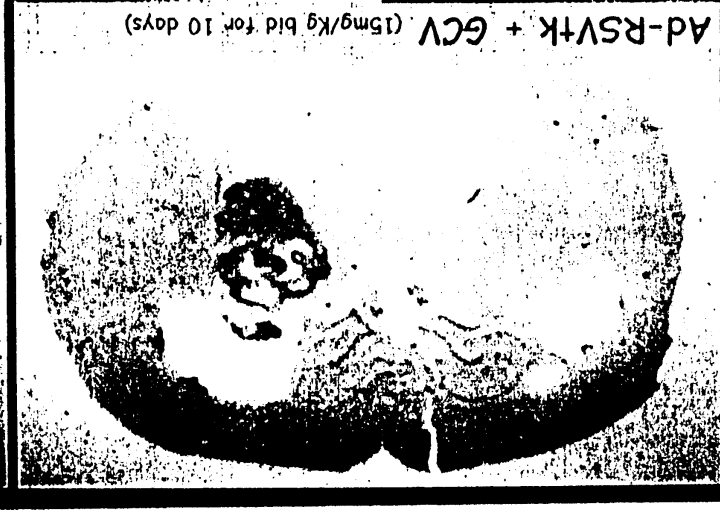




control

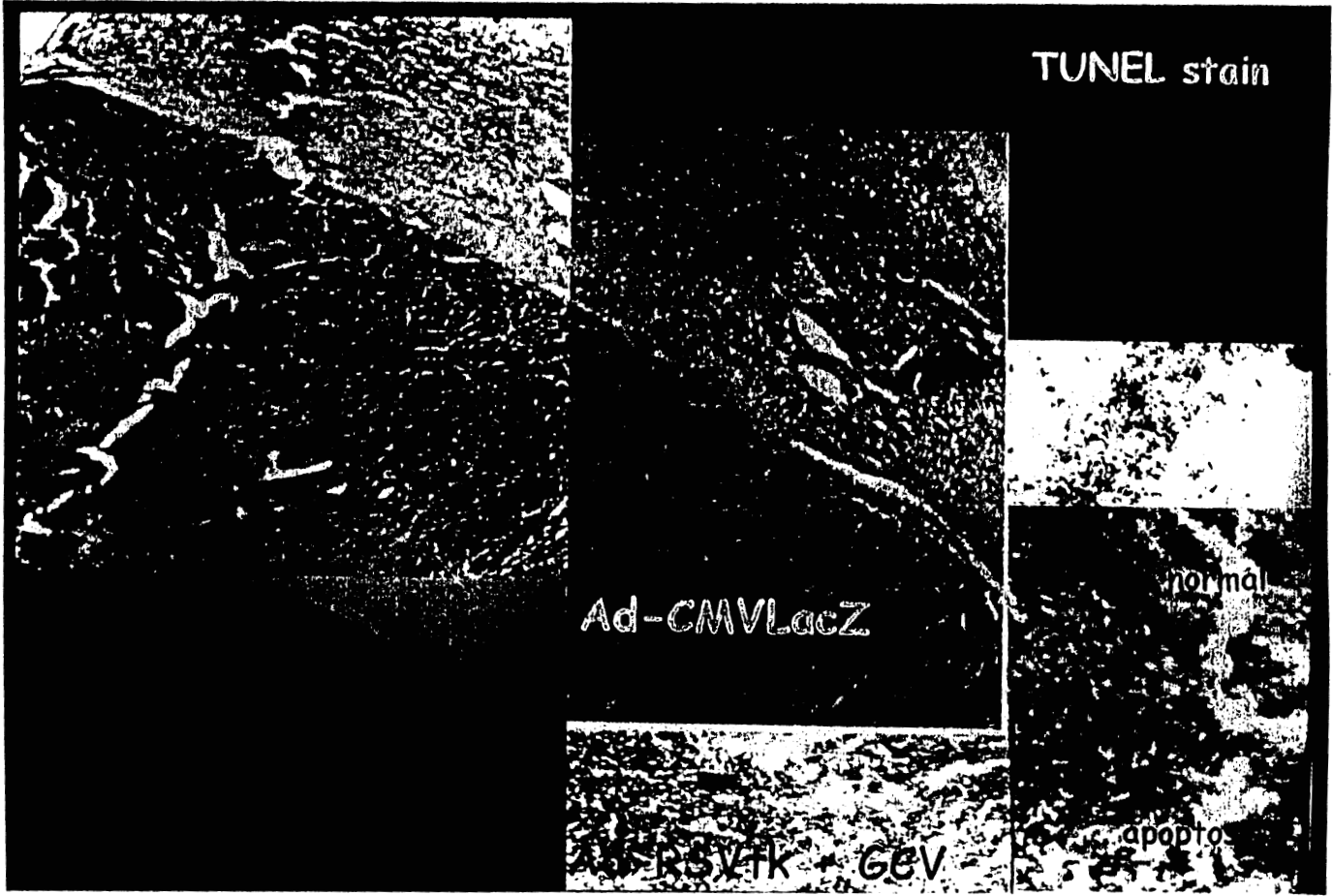


Ad-RSVtk + GCV (15mg/kg bid for 10 days)

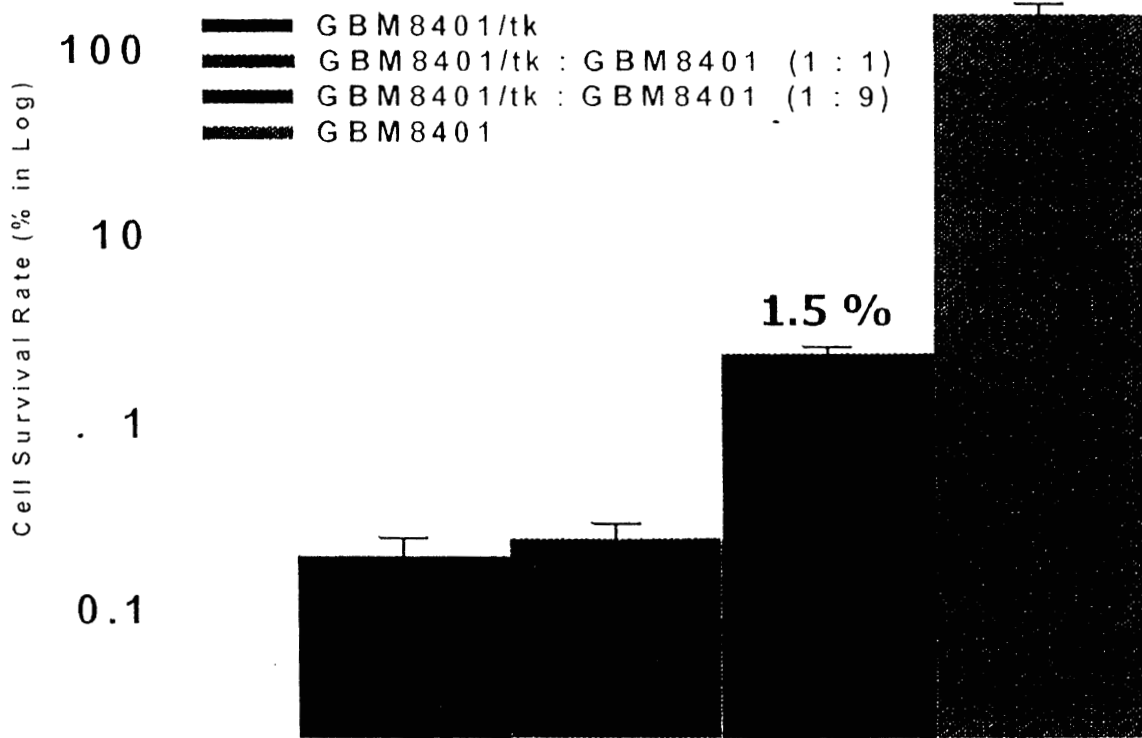


## Tumor Growth in Response to Ad-RSVtk Infection Followed by GCV Treatment:

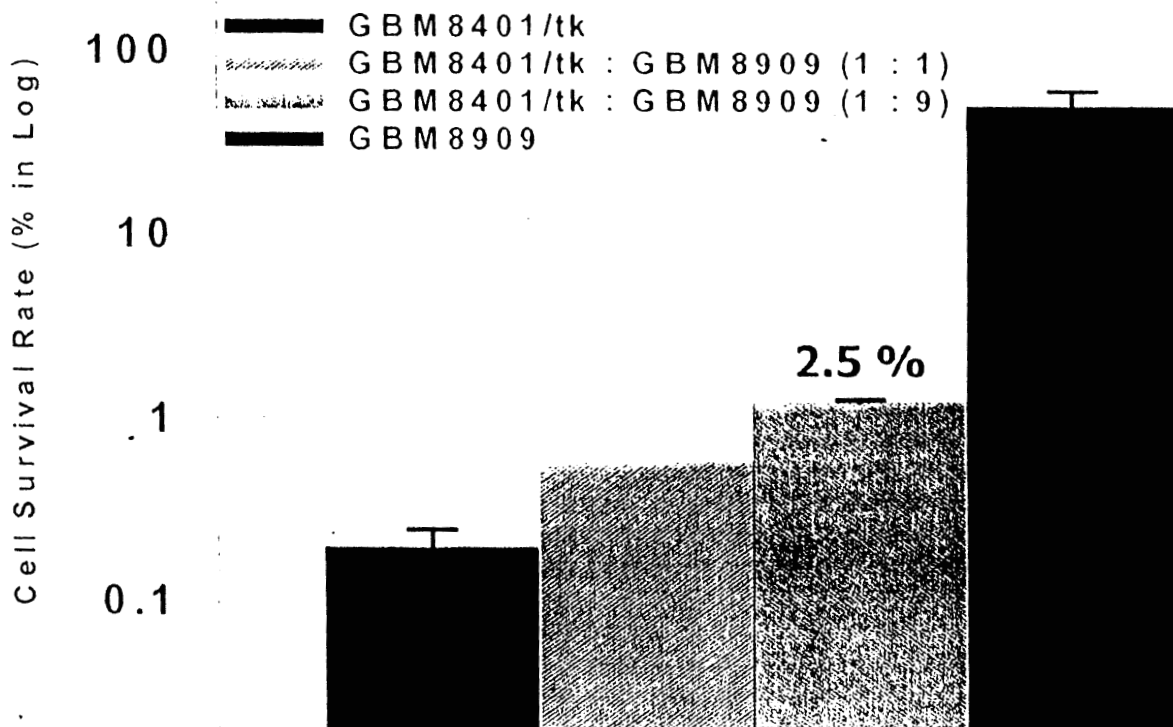
Cell Lines <sup>a</sup>	Ad-RSVtk + PBS <sup>b</sup>	Ad-RSVtk + GCV <sup>b</sup>	Percentage of volume reduction <sup>c</sup>
	0.25 ± 0.02 mm <sup>3</sup>	0.029 ± 0.005 mm <sup>3</sup>	88
	0.17 ± 0.05 mm <sup>3</sup>	0.03 ± 0.01 mm <sup>3</sup>	82.4
	0.11 ± 0.001 mm <sup>3</sup>	0.008 ± 0.001 mm <sup>3</sup>	92.8



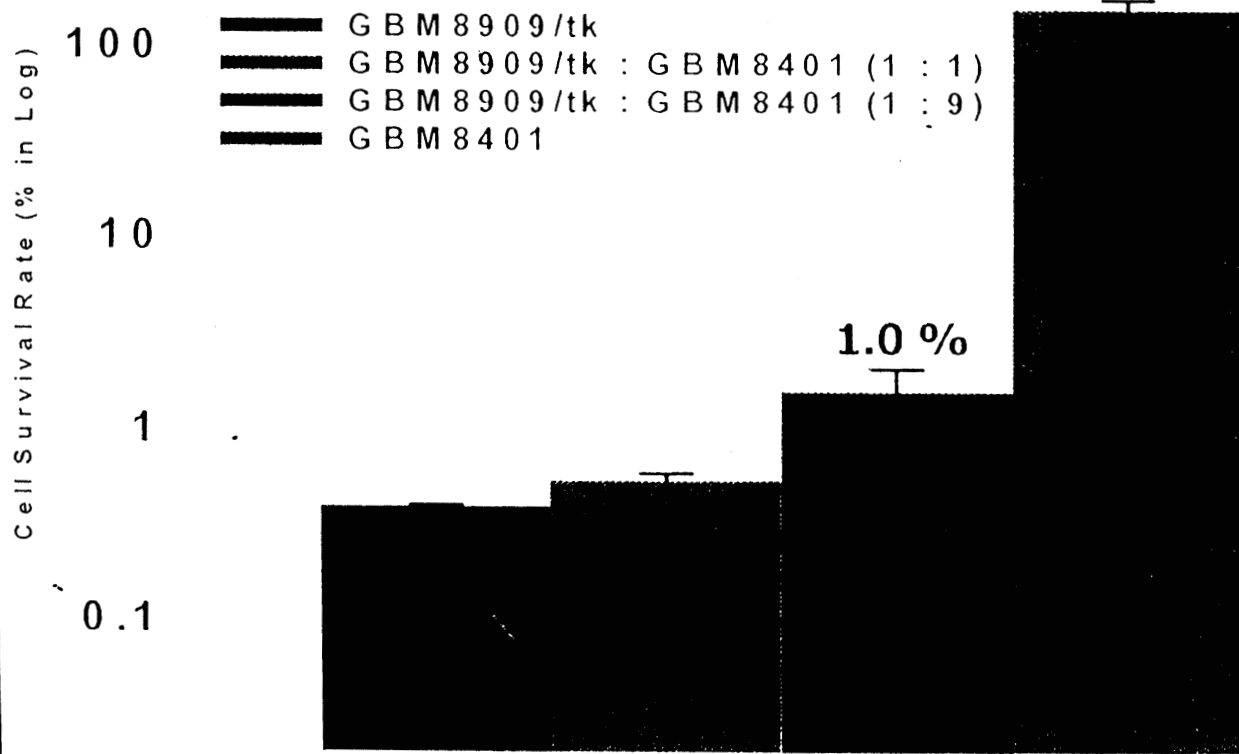
**4 x 10<sup>5</sup> in [3.5] GCV: 10 μM for 5 days**



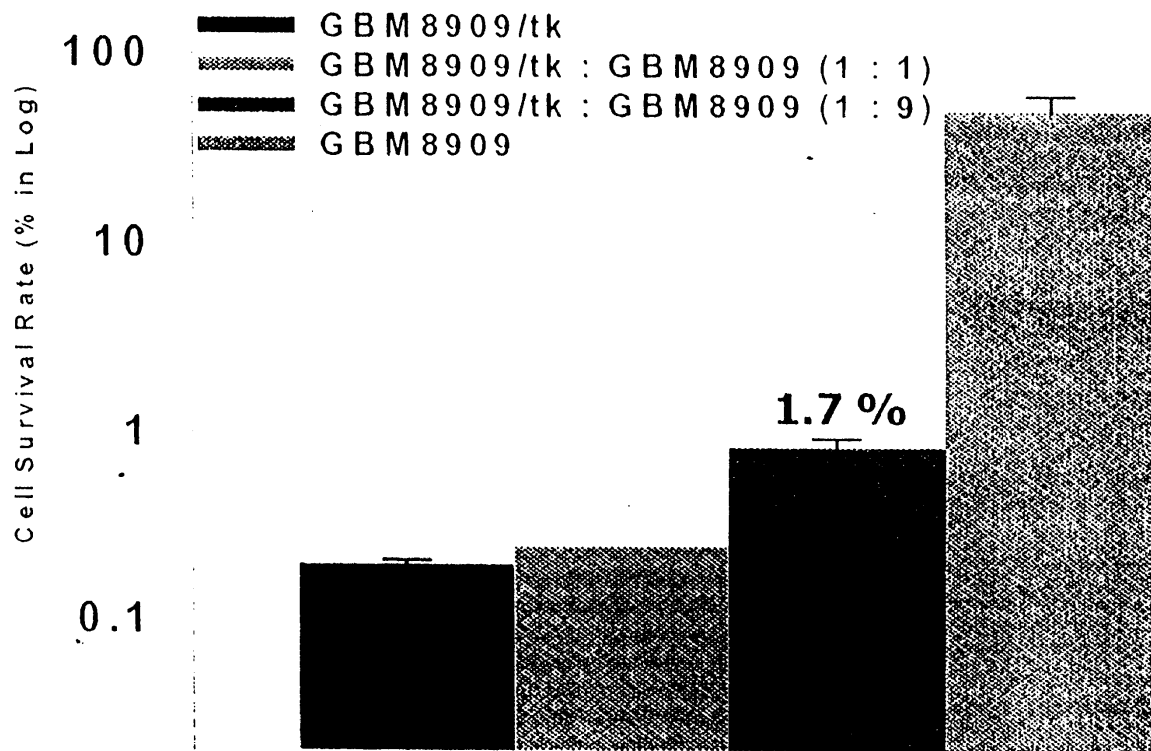
$4 \times 10^5$  in [3.5] GCV: 10  $\mu$ M for 5 days

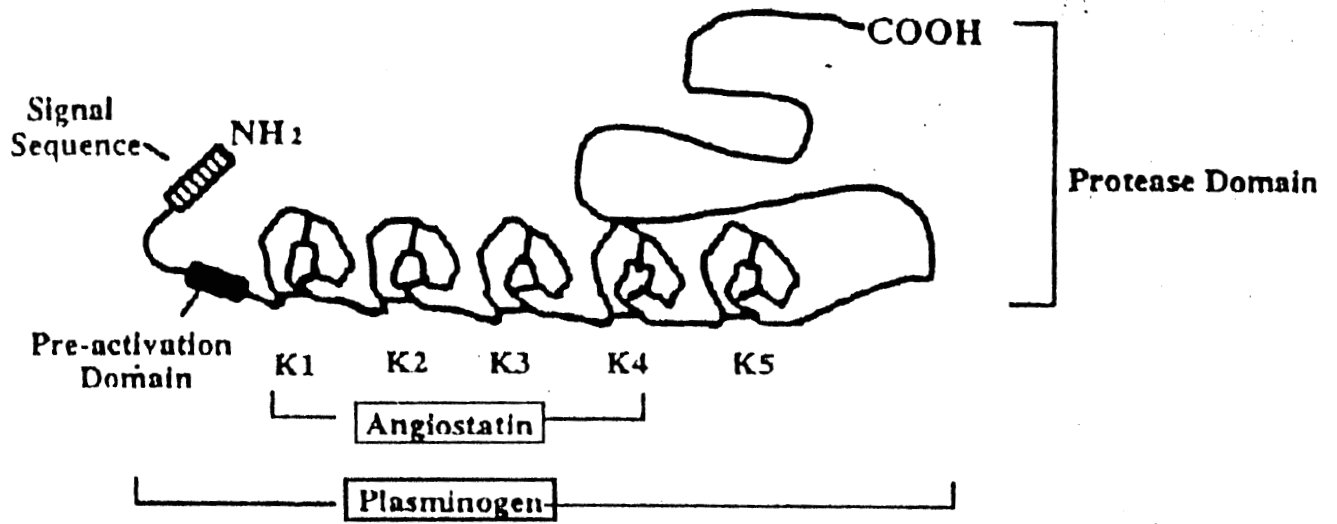


**$4 \times 10^5$  in [3.5]** GCV: 10  $\mu$ M for 5 days



**4 x 10<sup>5</sup> in [3.5]** GCV: 10 μM for 5 days

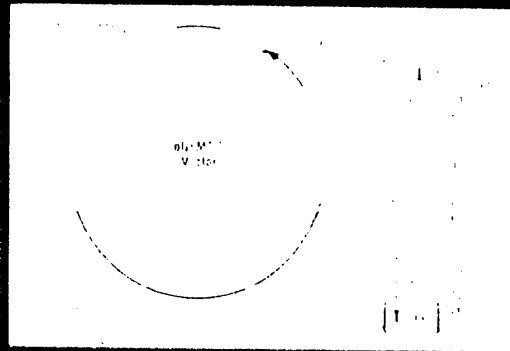




# Genetically-modified cell-targeted Antiangiogenic Gene Therapy Utilizing an Angiostatin Complementary DNA:

-produced by PCR:

-cloned to pGEM-T



-( mAng -HA/pGEMT/ BamHI; after gel isolation; 1.4 Kb fragment) +  
( pCEP4/BamHI; dephosphate; gel isolation; 10.4 Kb)  
= mAng-HA/pCEP4 (11.8 Kb)



mAngiostatin



# mAng-HA/pCEP4

CMV

SS

PA

K1

K2

K3

K4

HA

CMV: Cytomegalovirus promoter

SS: Signal sequence

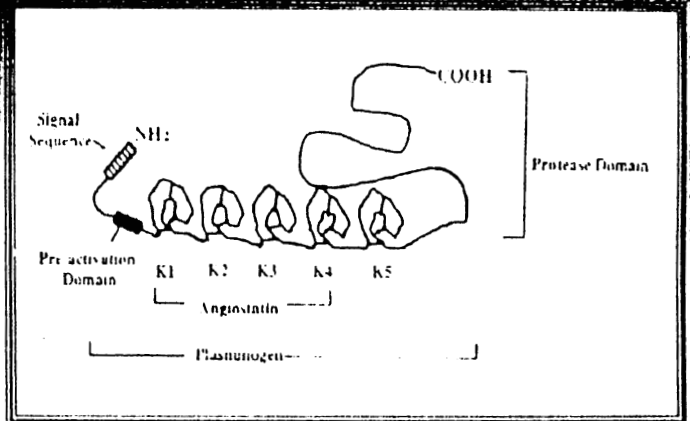
PA: Preactivation peptide

K1 - K4: Kringle structure 1-4

HA: HA epitope derived from influenza virus

mAng-HA: mAngiostatin (SS + PA + K1 + K2 + K3 + K4): 38 KDa

HA: 20 KDa



Ref: Cao Y et al. J Clin Invest 1998 101(5) 1055-1063

# Adenoassociated virus-targeted Antiangiogenic Gene Therapy Utilizing an Angiostatin Complementary DNA:

-produced by PCR:

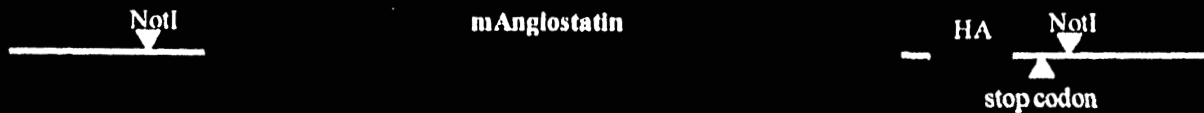
- cloned to pGEM-T

-(mAng -N/ pGEMT/ NotI; after gel isolation; 1.4 Kb fragment) +  
pXX-UF1/NotI; dephosphate; gel isolation; 6.6 Kb fragment)  
= mAng -HA/ pXX (8.0 Kb)

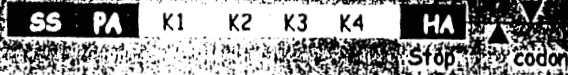
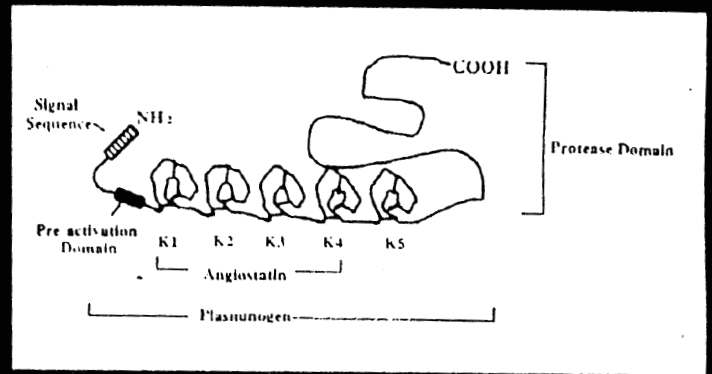


## pXX6

Tri-transfection with pXX2 and pXX6 in 293 cells to generate AAV-mAng-HA



# PXX-mAng-HA



SS: Signal sequence

PA: Preactivation peptide

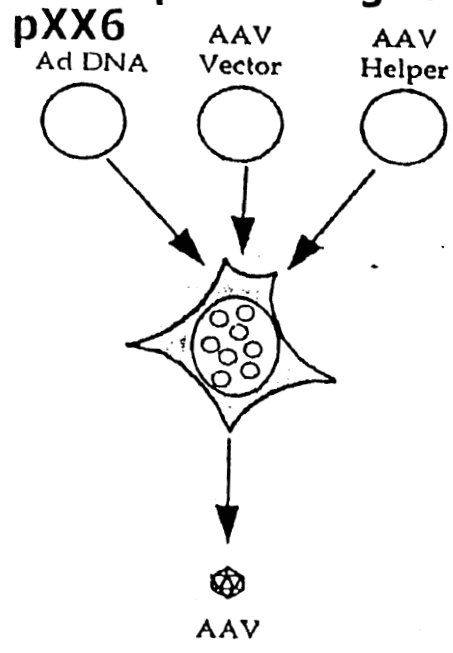
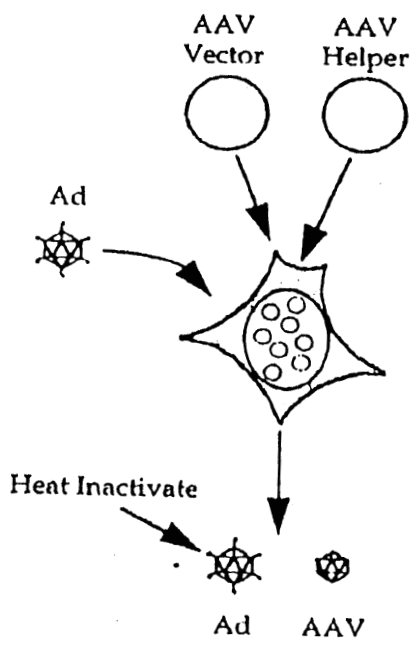
K1 - K4: Kringle structure 1-4

HA: HA epitope derived from influenza virus

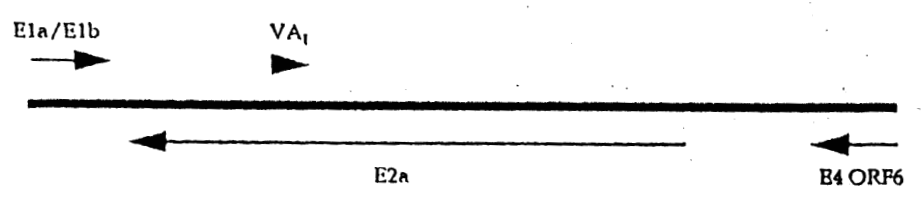
mAng-HA: mAngiostatin (SS + PA + K1 + K2 + K3 + K4): 38 KDa

HA: 20 KDa

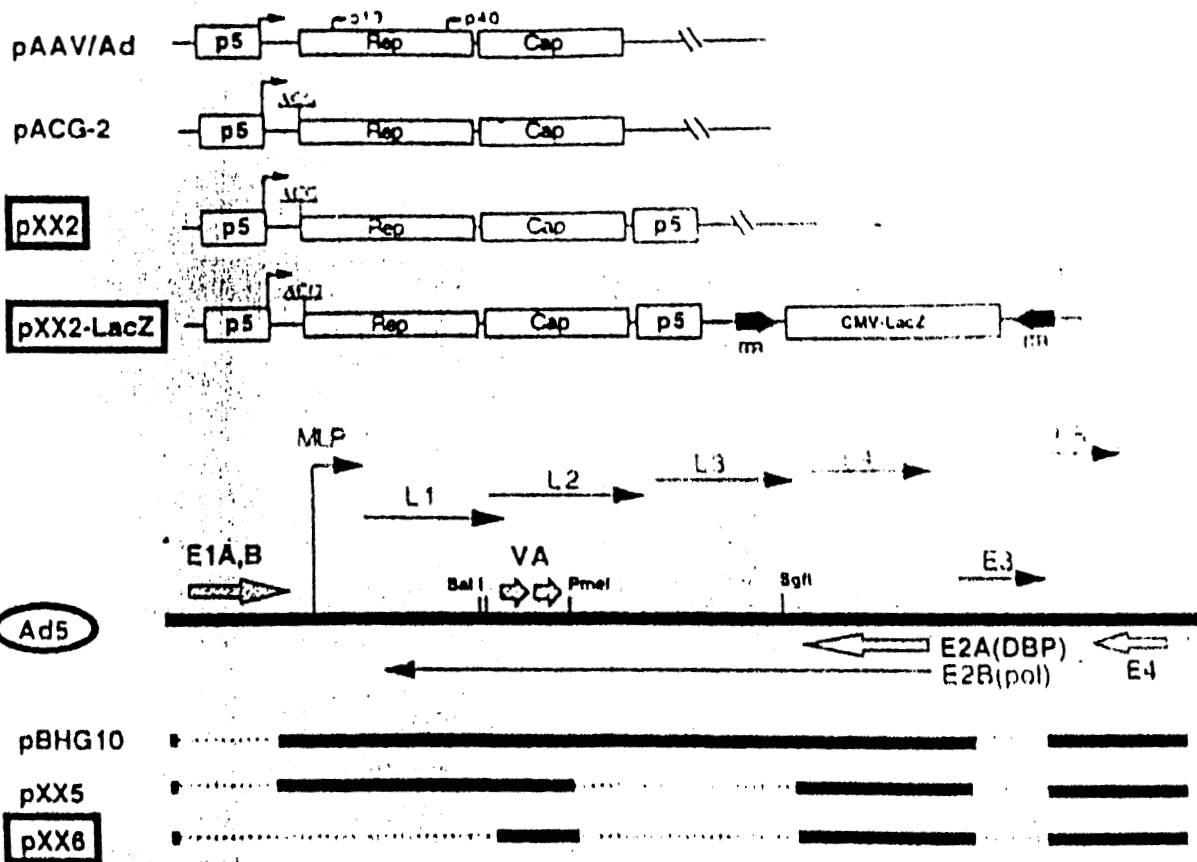
**pXX-mAng-HA**



**pXX2**

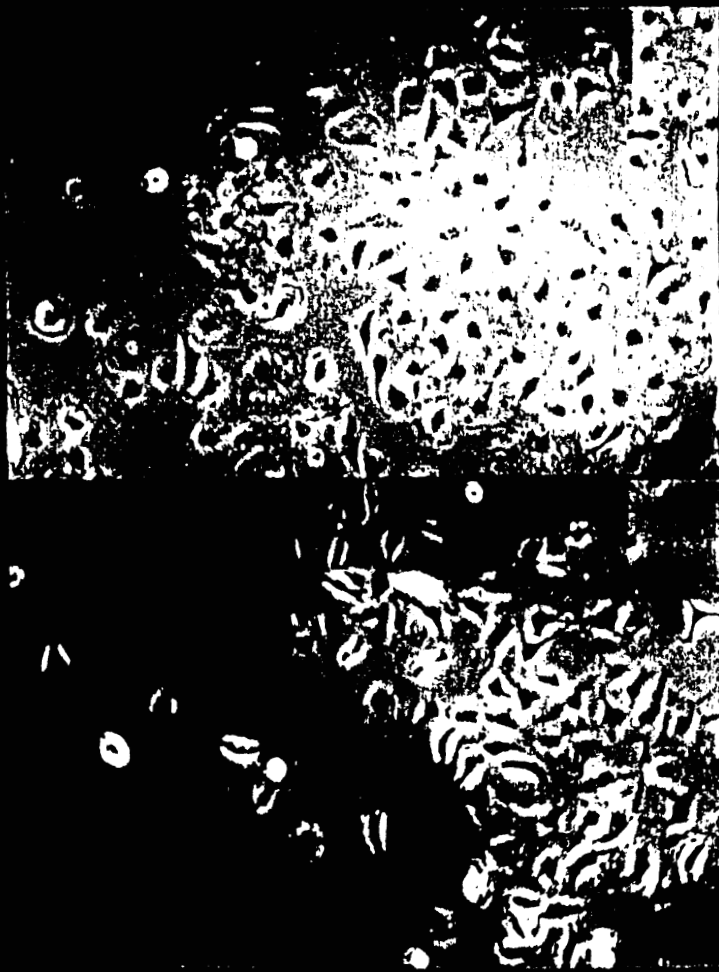


Schematic representation of the Ad genes necessary for the AAV helper effect.





**UVEC**



Study the  
growth:

of angiostatin to tumor

Total  
 $5 \times 10^5 / 5\mu\text{l}$   
cells

+



Day 0

Day 7

Day 14

Day 21

\*

Study the  
preexisting tumor:

of angiostatin to

Total $5 \times 10^5$ / 5 $\mu$ l cells	Ang-MA $20^5$ v.p. / 5 $\mu$ l
---	-----------------------------------



Day 0



Day 7

Day 14

Day 21

\*

215

441  
526

4946

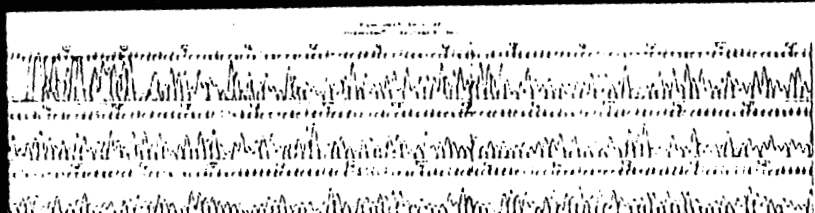
118

1414

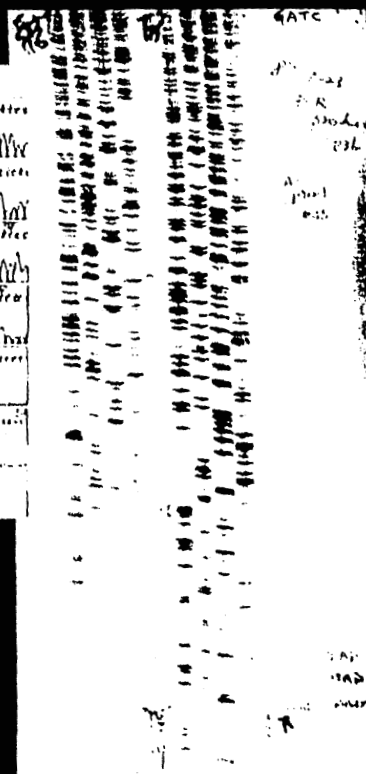
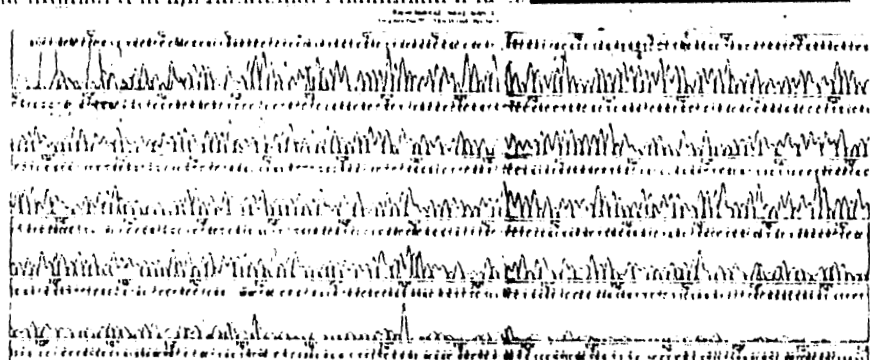
4941

**PCR**  
**mAngiostatin-HA**

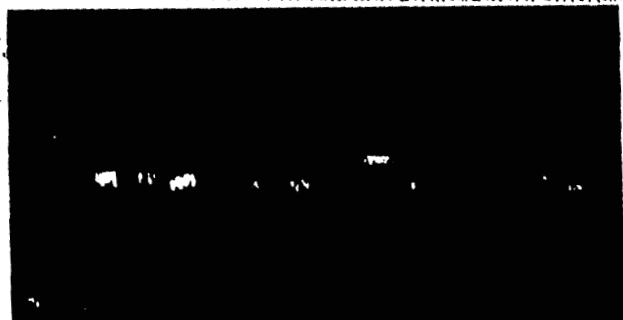
# mAngiostatin-HA/pGEM-T



Handwritten notes and labels on the left side of the gel, including 'mAngiostatin-HA/pGEM-T' and other illegible text.



Control

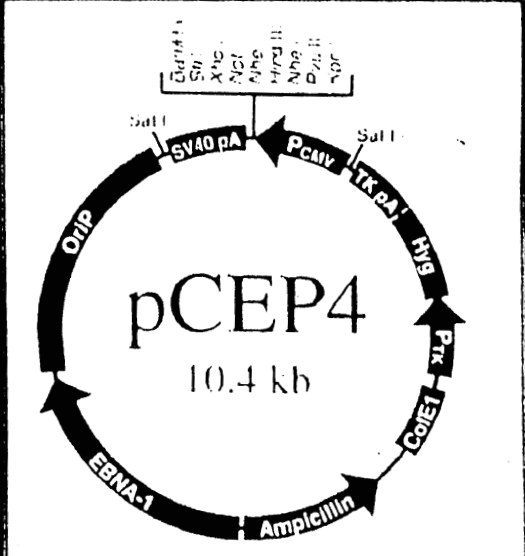


Handwritten text below the central image, possibly a date or identifier like '12/11/03'.



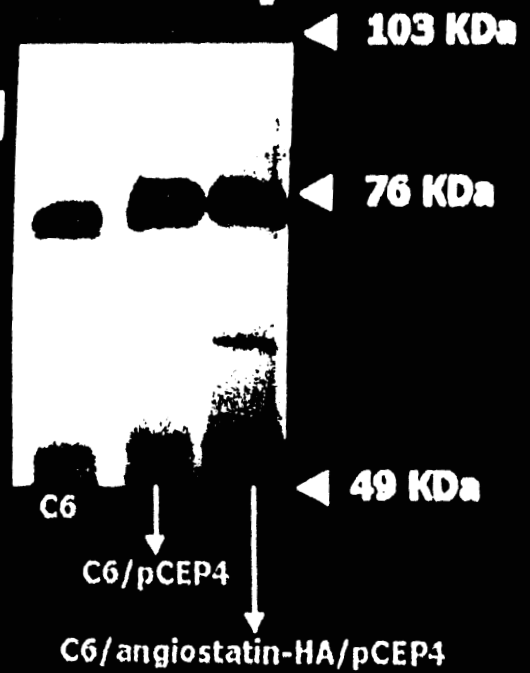


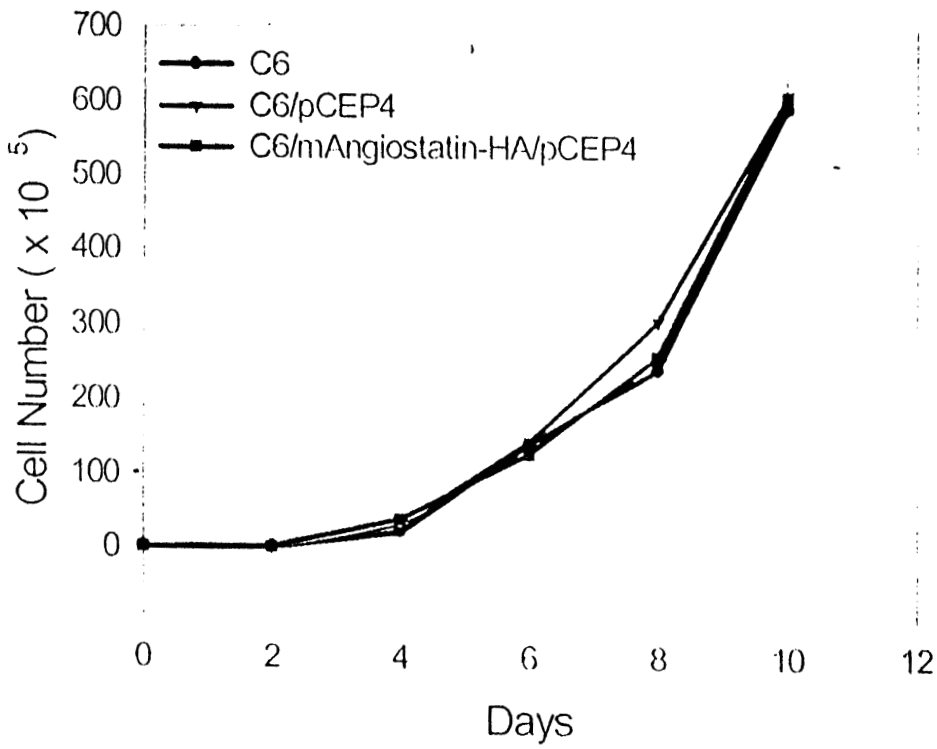
# mAngiostatin-HA/pCEP4



**Generated by Genetically-modified**

**C6 Glioma Cells which Had  
Been Transfected with  
Angiostatin/pCEP4**





**C6**



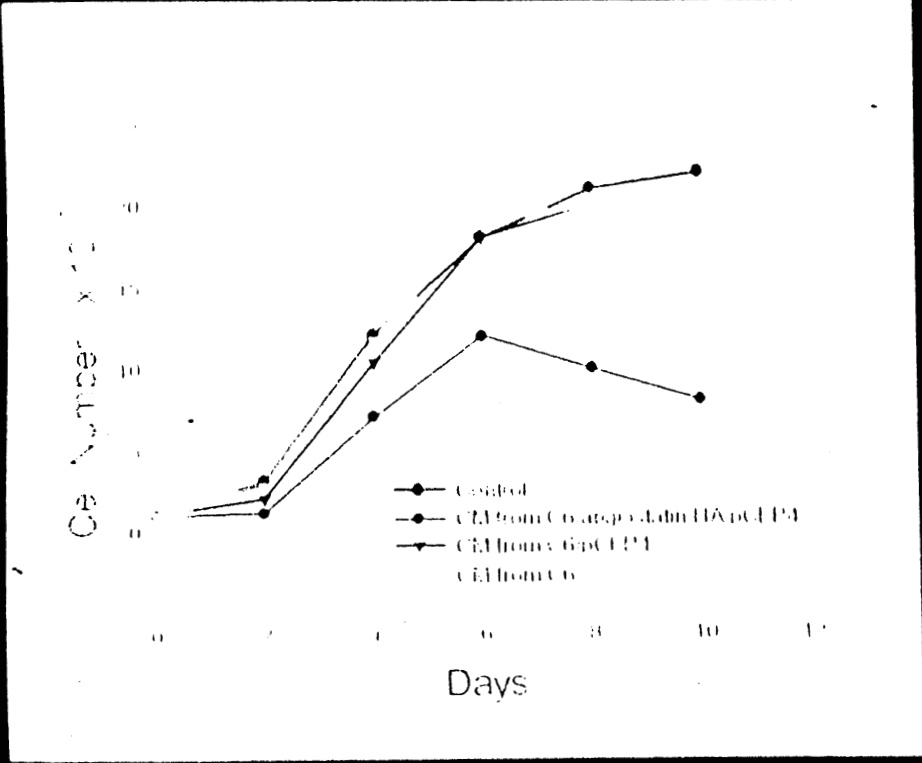
**C6/pCEP4**



**C6/mAng-HA  
/pCEP4**



# Inhibition of HUVE Cells Proliferation by Conditioned Medium Which Containing Angiostatin





C6/pCEP4

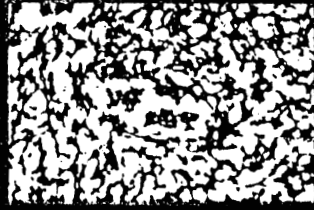


C6/mAng-HA/pCEP4

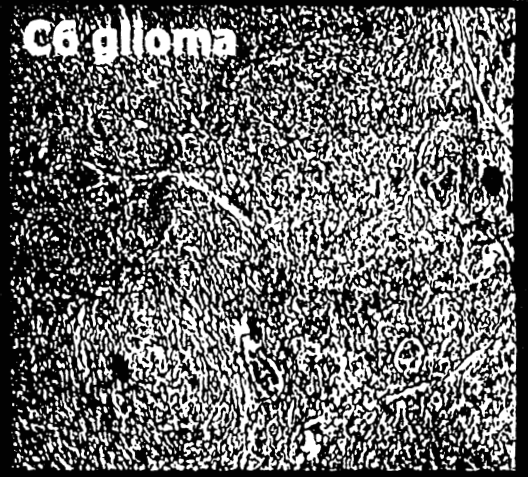




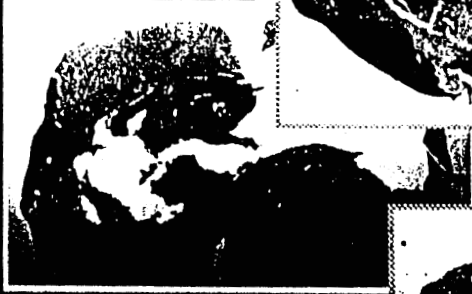
**C6 2 wks**



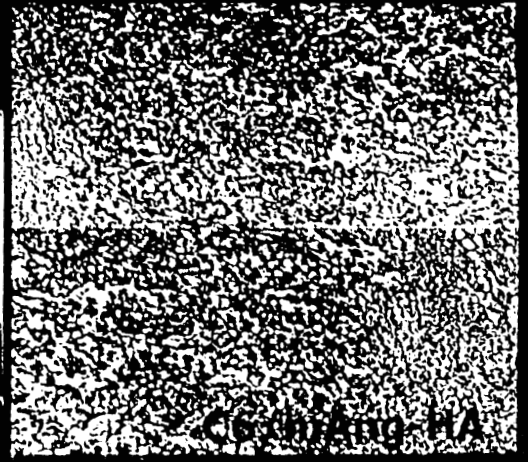
**C6 glioma**

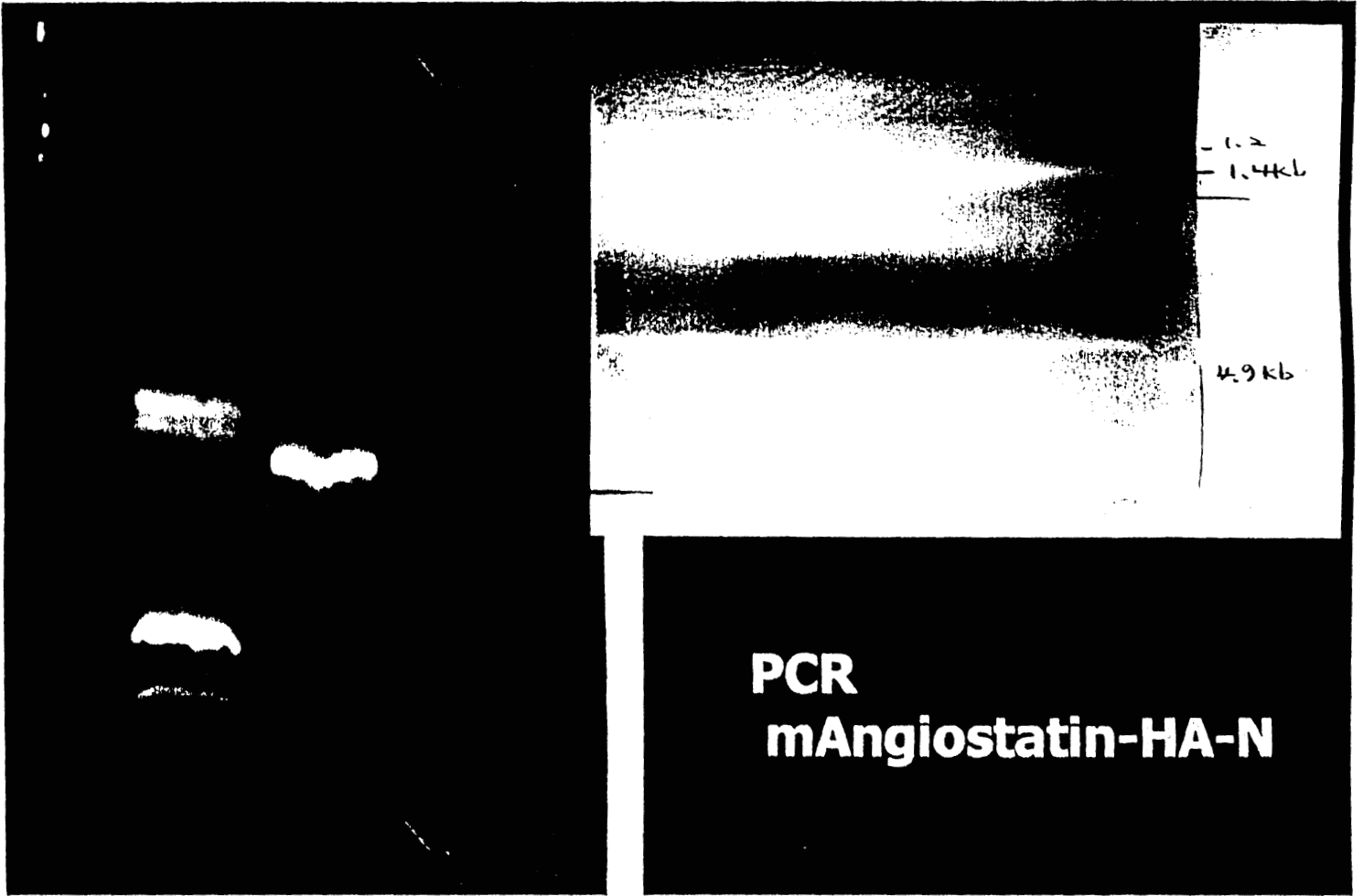


**C6/pCEP4 2wks**

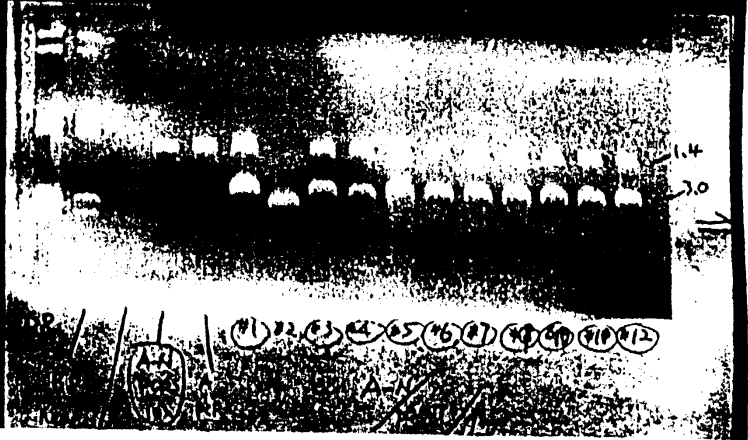


**C6/mAng-HA 2 wks**





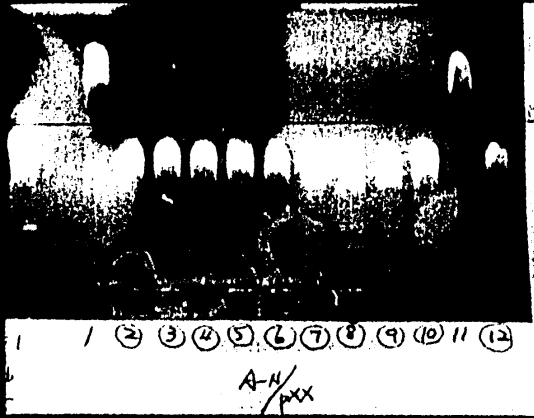
# mAngiostatin-HA-N/pGEM-T



/ #1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12  
 show  
 next  
 .1  
 Avg. N/  
 /count

[Faint, illegible handwritten notes and data entries, likely bleed-through from the reverse side of the page.]

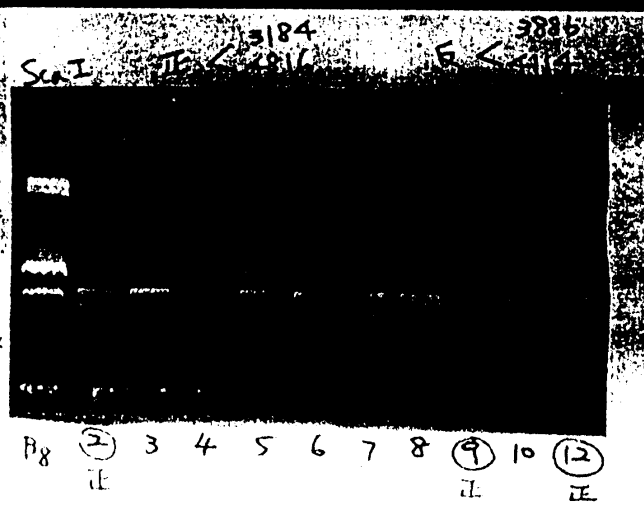
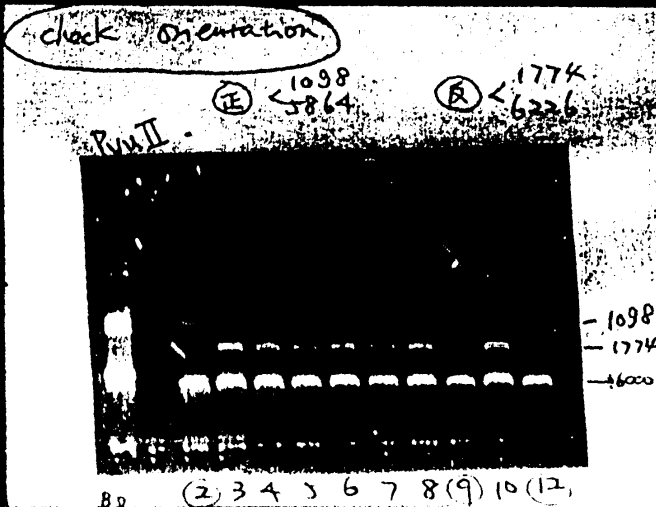
[Faint, illegible handwritten notes and data entries, likely bleed-through from the reverse side of the page.]



全部切出 insert & vector

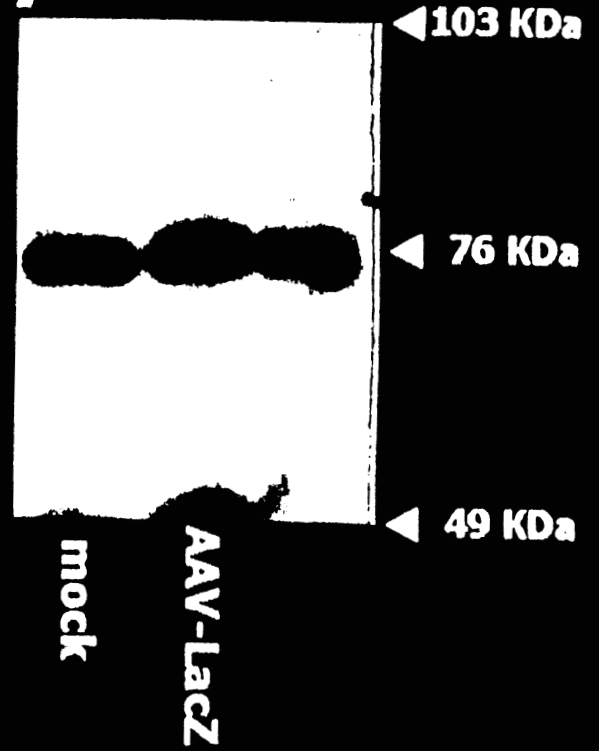
#2	#7
#3	#8
#4	#9
#5	#10
#6	#12

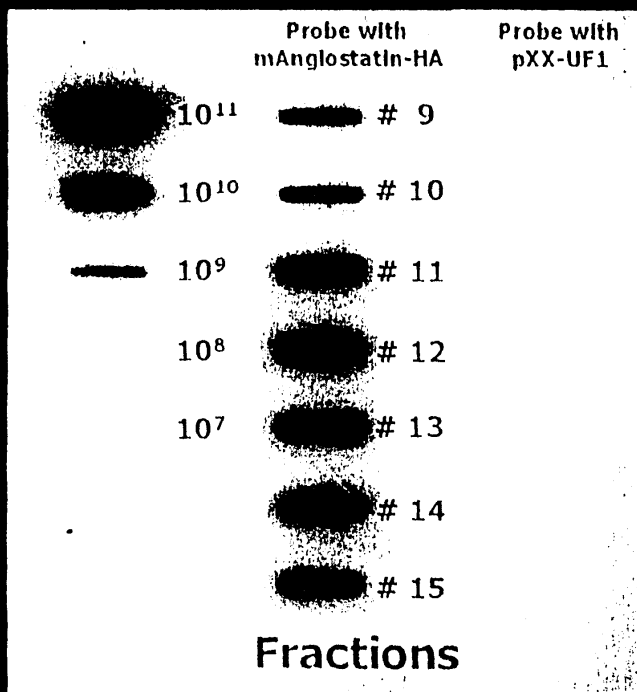
# pXX-mAngiostatin-HA



**Generated by C6 Glioma**

**Cells Which Had Been  
Transduced with  
AAV-angiostatin**



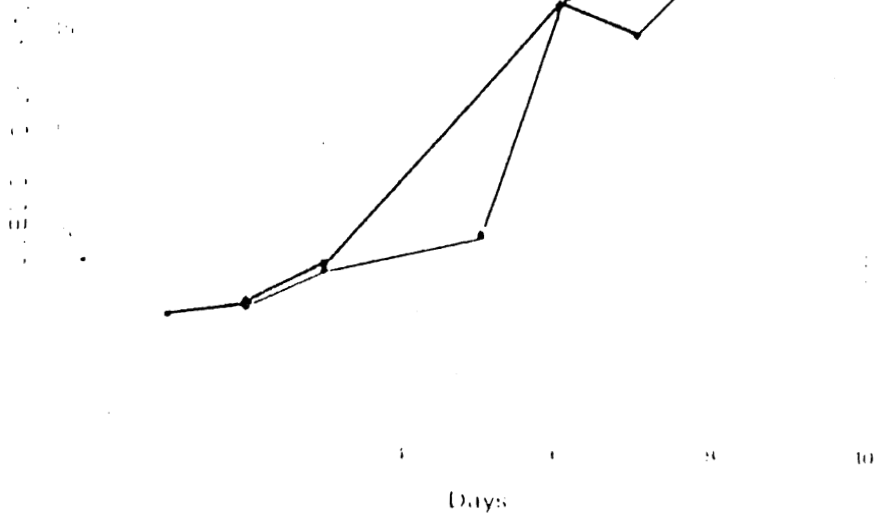


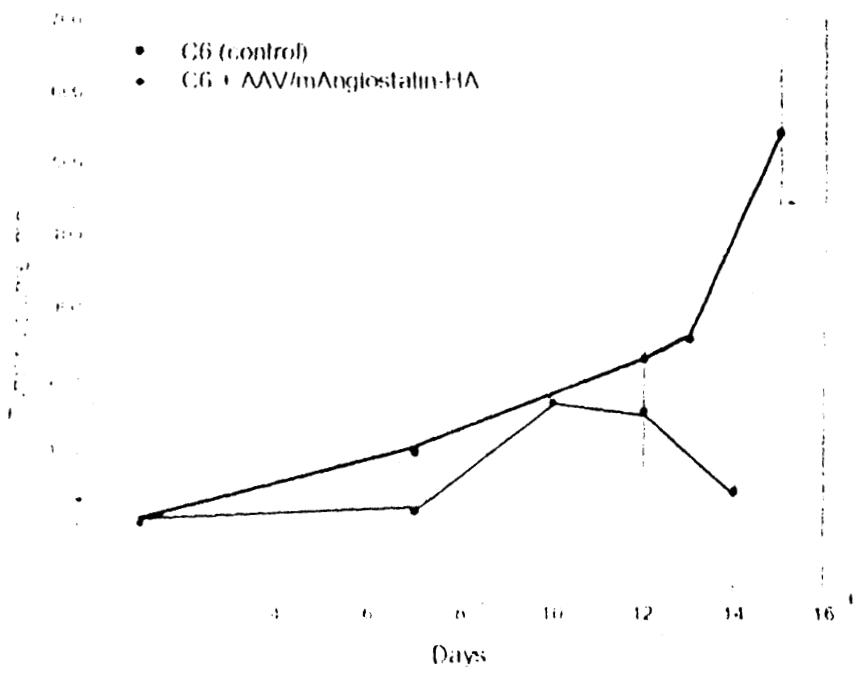
## Slot Blot Assay

for detecting the titer of recombinant AAV-mAngiostatin-HA

## Inhibition of UVEC Cells Proliferation by AAV-angiostatin

- Control, without adding AAV
- AAV/mAngiostatin HA

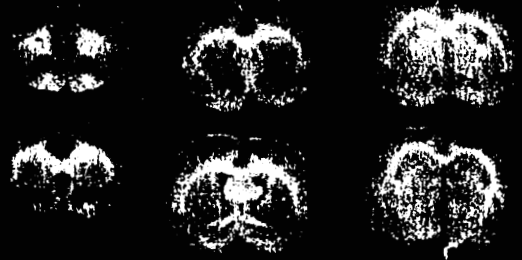




**C6 7 days**



**C6 + AAV/mAngiostatin-HA  
7 days**



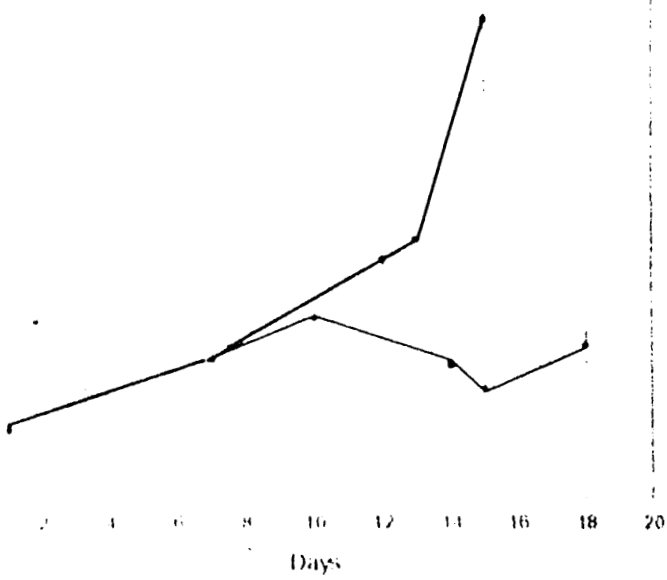
**C6 14 days**



**C6 + AAV/mAngiostatin-HA  
14 days**

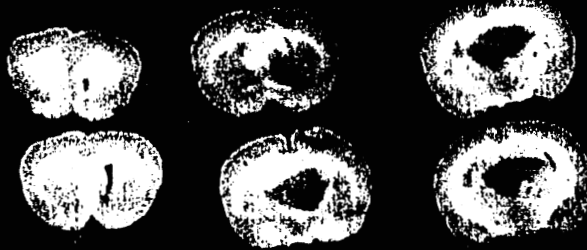


- C8 (control)
- C6 7 days + AAV/mAngiostatin-11A

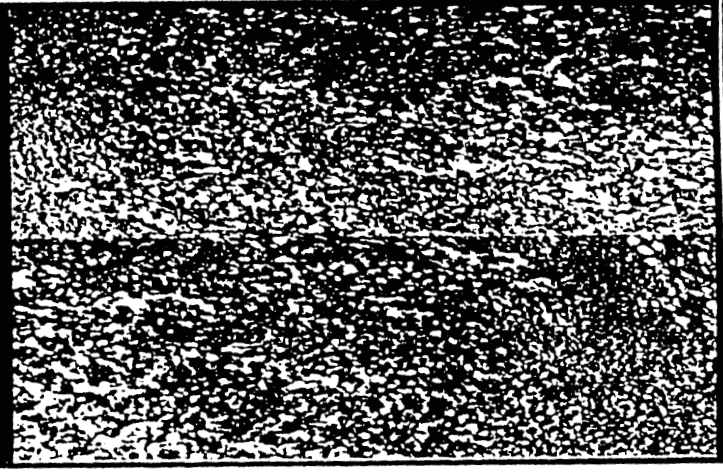
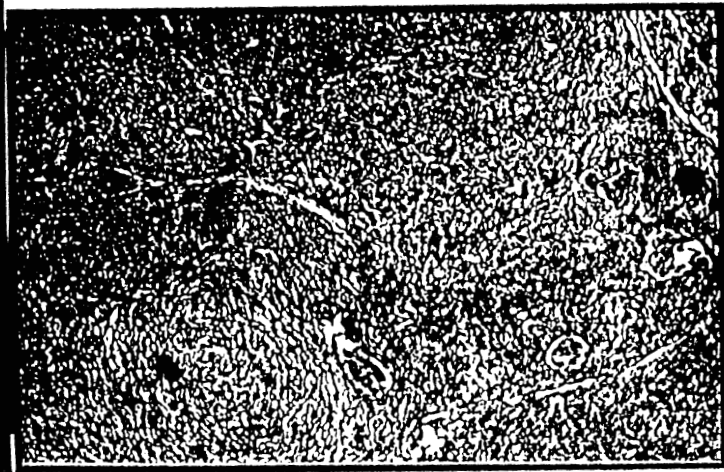
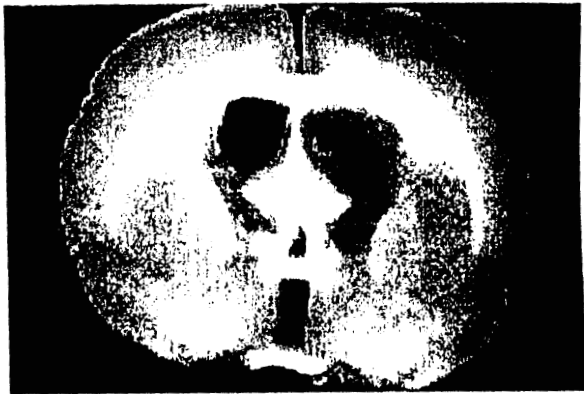
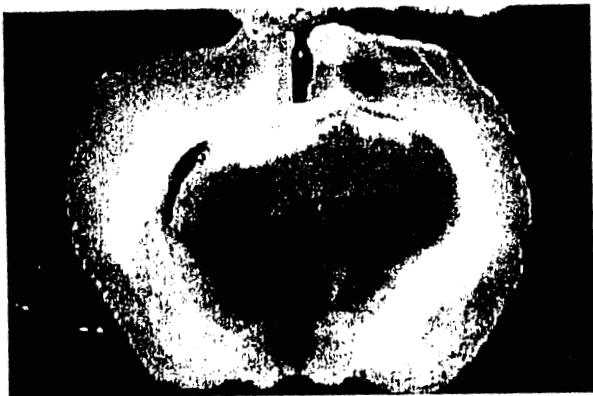


# Shrinkage effect

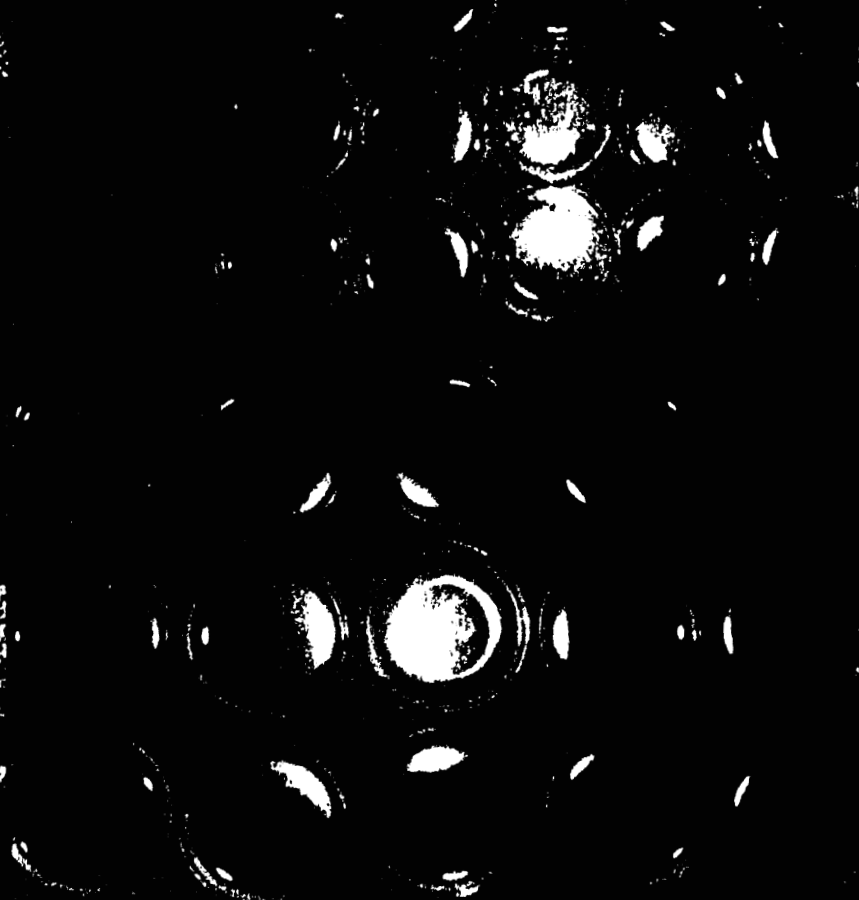
C6 7 days



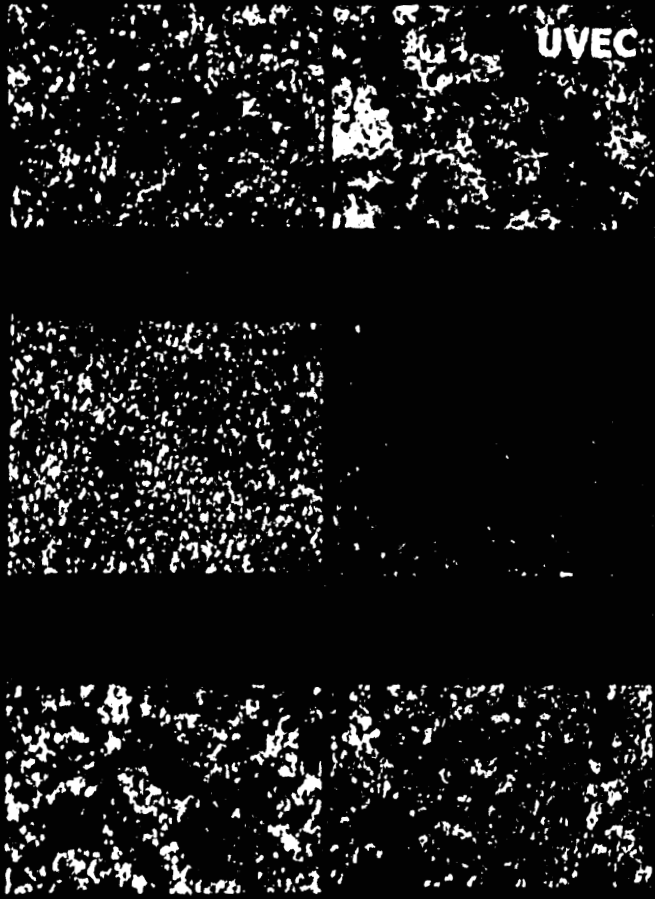
C6 14 days



**UVEC**

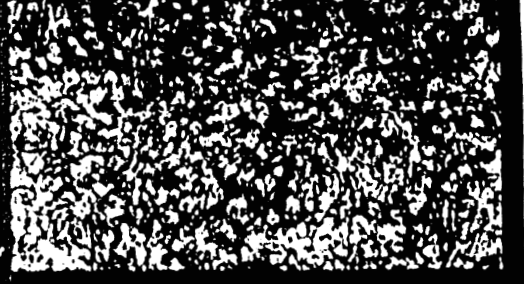
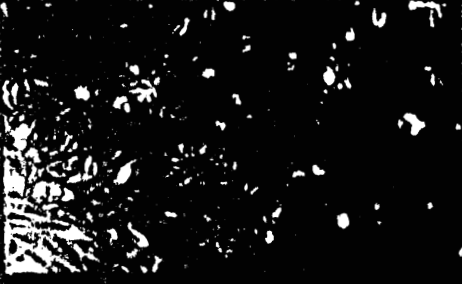


**AAV-LacZ + Adv-tk**



GBM8401

GBM8909



AAV-LacZ + Adv-tk

AdRSV-1k  
 $10^{12}$  v.p./5 $\mu$ l

+

Total  
 $5 \times 10^6$  /5 $\mu$ l  
C6 cells

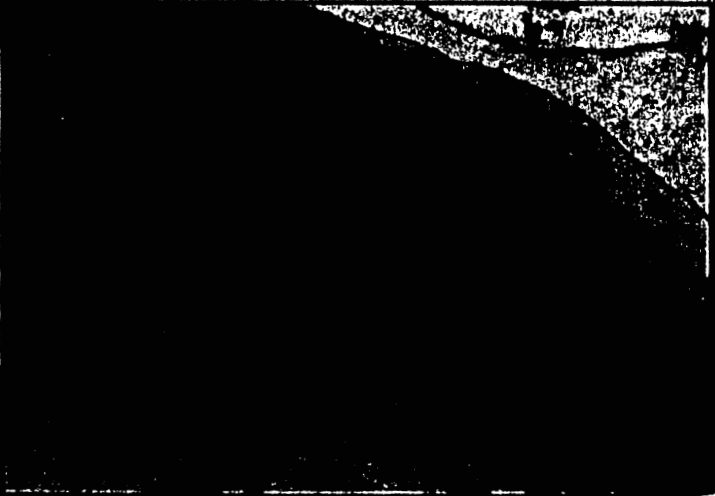
AAV-LacZ  
 $10^9$  v.p./5 $\mu$ l

perfusion

Day 0

Day 7

Day 30



#### 四. 計劃成果自評

進度按照預訂進度，進行順利。

#### 未來計劃(1)

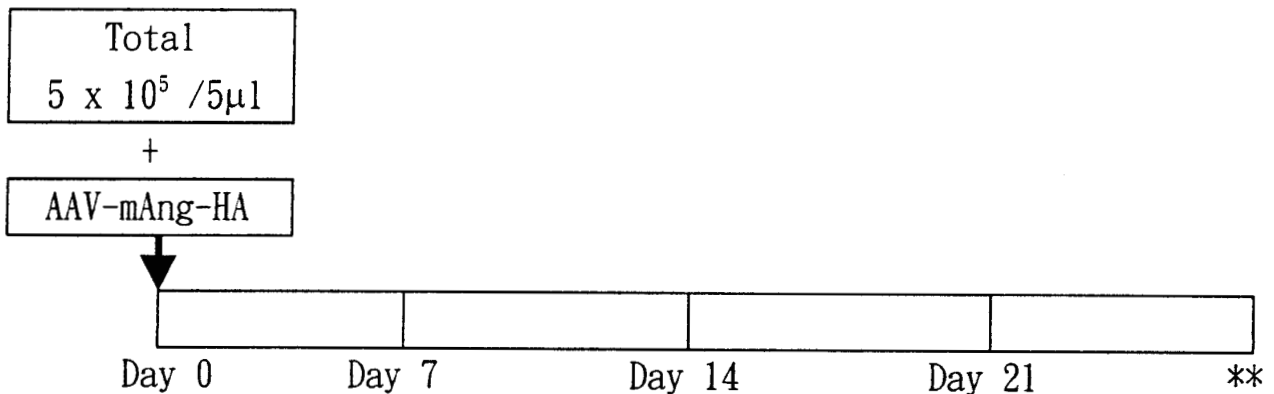
1. Study the transduction efficiency of AAV-LacZ in normal brain:

Intraventricular injection of AAV-pdXIIILacZ:

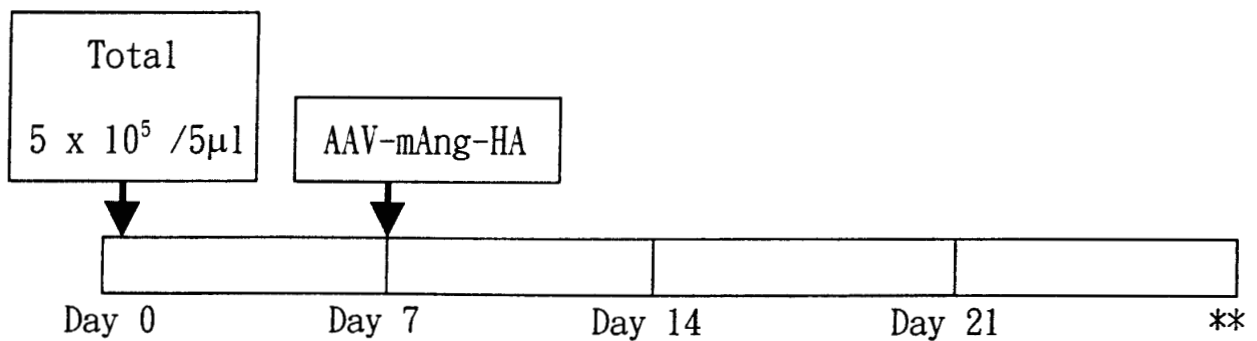
-X-gal staining: 2 weeks, 4 weeks, 6 weeks, 8 weeks after the AAV-LacZ injection

2. Gene therapy with AAV-mAngiostatin-HA in "Human GBM cell lines-nude rat animal model".

(1) Inhibitory effect strategy in AAV-mAngiostatin-HA group:



(2) Shrinkage effect strategy in AAV-mAngiostatin-HA group. :



(3)Check up 1). tumor volume

2). Survival time

3). Immunohistochemical stain:

Factor VIII (Vessel Counts/HPF)

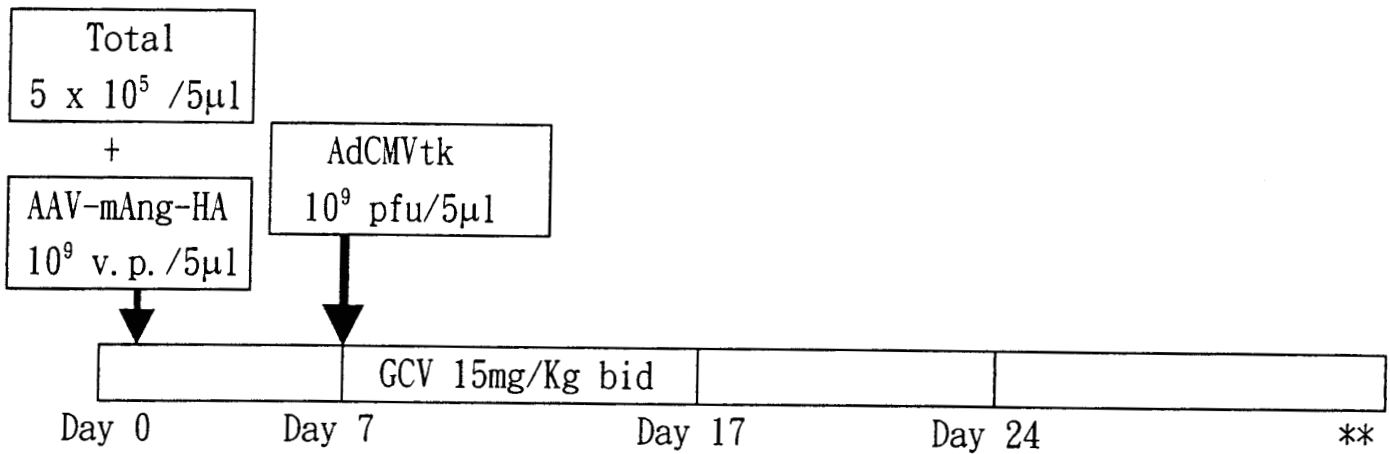
PCNA (Labelling index; %)

TUNEL (Apoptosis index; %)

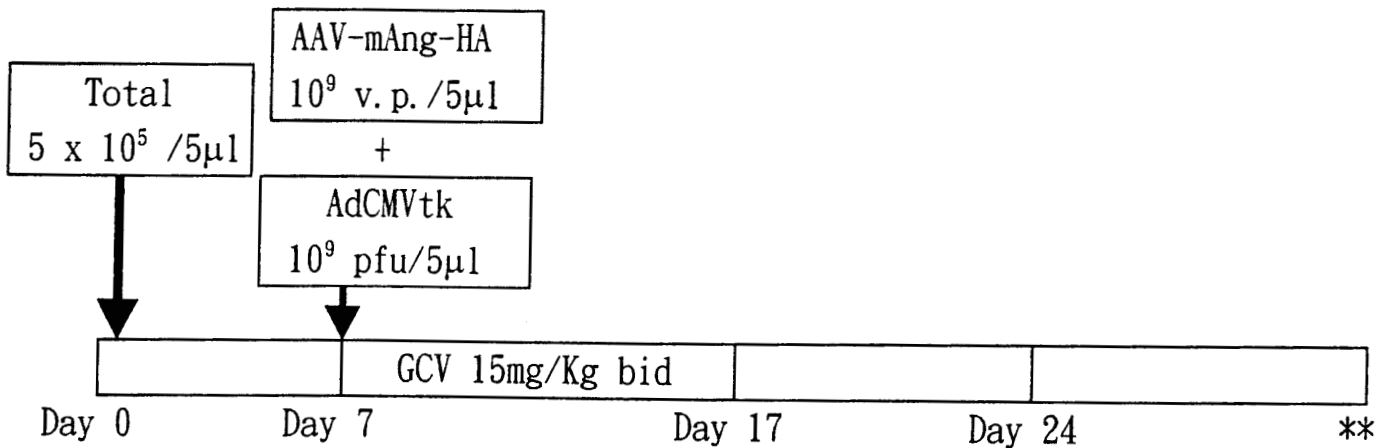
3. Combined therapy:

(1)Study the inhibitory effect of angiostatin to tumor growth and HSVtk + GCV

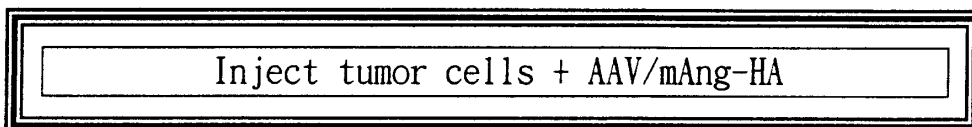
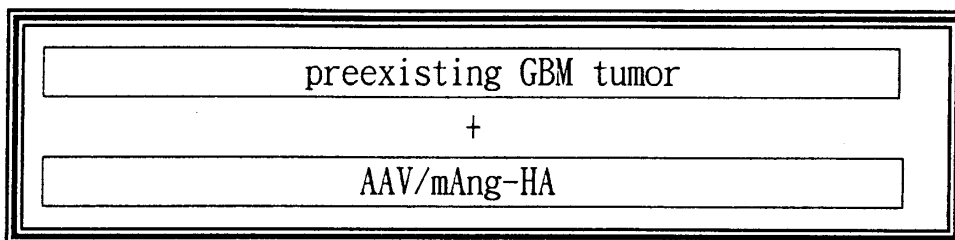
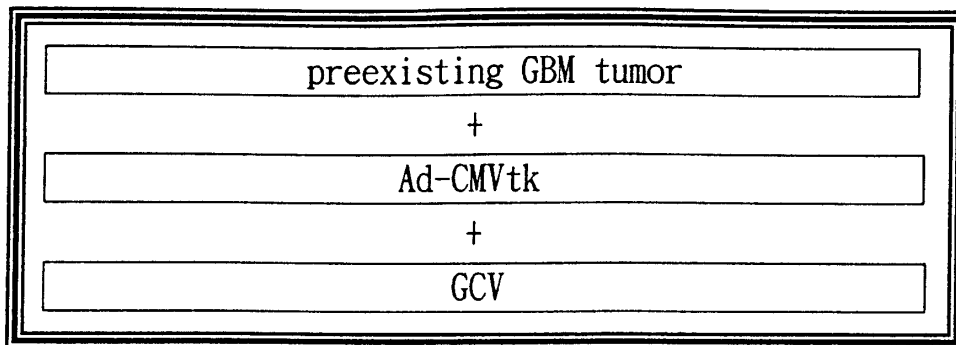
killing effect of tumor cells:



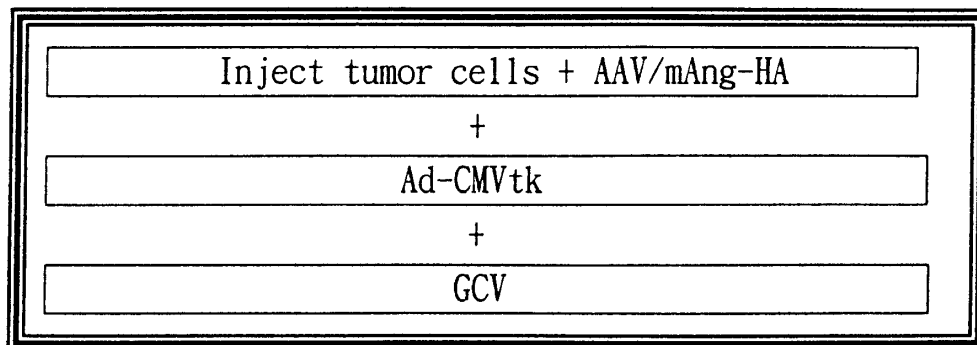
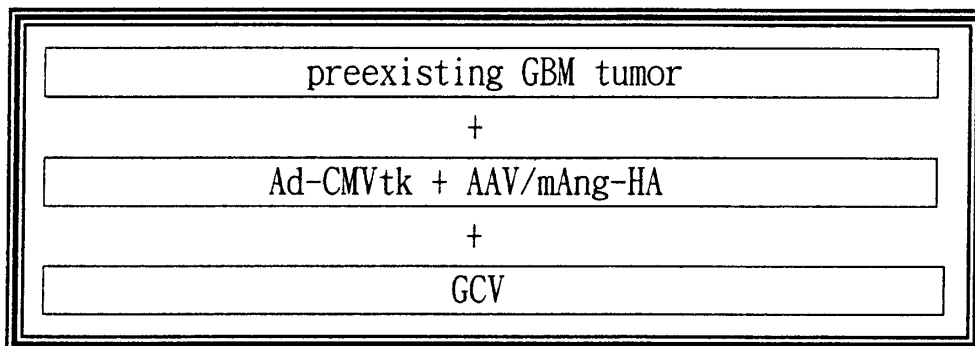
(2)Study the shrinkage effect of angiostatin to preexisting tumor and HSVtk + GCV killing effect of tumor cells:



Traditional therapy:



Combined therapy



## 未來計劃(2)

### 1. Immunohistochemical analysis: (Tanaka et al., 1998)

- for assessing tumor vascularity and growth characteristics
- visualized with streptavidin-peroxidase complex
- positive staining detected by substrate reaction with  
diaminobenzidine
- counterstained with methyl green and mounted in permount

#### FVIII-related antigen (von Willebrand factor):

- 200X on areas of tumor with the highest density of vascular staining

#### PCNA (Proliferation cell nucleic antigen):

- 400X as a percentage of positive nuclei to total cells

#### Classification of samples:

7th, 14th, 21th day brain tumor samples with C6, C6/pCEP4,  
C6/mAngiostatin-HA/pCEP4.

#### (1)Inhibitory effect strategy in AAV-mAngiostatin-HA group:

7th, 14th, 21th day, after C6 & AAV-mAngiostatin-HA  
injection.

#### (2)Shrinkage effect strategy in AAV-mAngiostatin-HA group.:

7th, 14th, 21th day, after C6 injection.

### 2. In situ apoptotic cell detection assay:

-detect apoptotic cells

-Apo Tag Plus In Situ Apoptosis Detection Kit Peroxidase (Oncor,  
Gaithersburg, MD, USA)

-apoptotic index: percentage of positive staining cells visualized under  
400X

## 五. 參考文獻

- Akli S, Caillaud C, Vigne E, Stratford-perricandet LD, Poenaru L, Perricaudet M, Kahn A, Peschanski MR: Transfer a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nat. Genet.* 3: 224-228, 1993.
- Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E: Vascular endothelial growth factors acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat. Med.* 1: 1024-1028, 1995.
- Altman S: RNA enzyme-directed gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 10898-10900, 1993.
- Andreansky SS, He B, Gillespie GY, Soroceanu L, Markert J, Chou J, Roizman B, Whitley RJ: The application of genetically engineered hepes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 11313-11318, 1996.
- Atchison RW, Casto BC, Hammon W: Adeno-associated defective virus particles. *Science* 149: 754-756, 1965.
- Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E: Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: Implications for coronary angiogenesis. *Cardiovas. Res.* 28: 1176-1179, 1994.
- Barba D, Hardin J, Sadelain M, Gage FH: Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 4348-4352. 1994.
- Barendsz-Janson AF, Griffioen AW, Muller AD, van Dam-Mieras MC, Hillen HF: In vitro tumor angiogenesis assays: Plasminogen lysine binding site 1 inhibits in vitro tumor-induced angiogenesis. *J. Vasc. Res.* 35(2): 109-114, 1998.
- Baringa M: Designing therapies that target tumor blood vessels. *Science* 275: 482-484, 1997.
- Battegay EJ: Angiogenesis: Mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J. Mol. Med.* 73(7): 333-346, 1995.

- Berkner KL: Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. *Biotechniques* 6: 616-629, 1988.
- Berns KI: Parvovirus replication. *Microbiol. Rev.* 54: 316-329, 1990.
- Berns KI and Giraud C: Adenovirus and adeno-associated virus as vectors for gene therapy. *Annals of the New York Academy of Science* 772: 95-104, 1995.
- Bi WL, Parysek LM, Warnick R, Stambrook PJ: In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSVtk retroviral gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 4: 725-731, 1993.
- Bicknell R and Harris AL: Anticancer strategies involving the vasculature: Vascular targeting and the inhibition of angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 3: 399-407, 1992.
- Bicknell R and Harris AL: Mechanisms and therapeutic implications of angiogenesis. *Curr. Opin. Oncol.* 8(1): 60-65, 1996.
- Bikfalvi A: Significance of angiogenesis in tumour progression and metastasis. *Eur. J. Cancer* 31A(7-8): 1101-1104, 1995.
- Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS: Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390: 404-407, 1997.
- Boehm T, O'reilly MS, Keough K, Shiloach J, Shapiro R, Folkman J: Zinc-binding of endostatin is essential for its antiangiogenic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9; 252(1): 190-194, 1998.
- Boviatsis EJ, Chase M, Wei MX, Tamiya T, Hurford RK Jr., Knowall NW, Tepper RI, Breakfield XO, Chiocca EA: Gene transfer into experimental brain tumors mediated by adenovirus, herpes simplex virus, and retrovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* 5: 183-191, 1994.
- Breakefield XO and Deluca NA: Herpes simplex virus for gene delivery to neurons. *New Biol.* 3: 203-218, 1991.
- Bredenbeek PJ, Frolov I, Rice CM, Schlesinger S: Sindbis virus expression vectors:

- Packaging of RNA replicon by using defective helper RNAs. *J. Virol.* 67: 6439-6446, 1993.
- Brogi E, Schstteman G, Wu T, Kim EA, Varticovski L, Keyt B: Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J. Clin. Invest.* 97: 469-476, 1996.
- Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfelt M, Hu T, Klier G, Cheresch DA: Integrin  $\alpha_v\beta_3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79: 1157-1164, 1994.
- Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, van de Water L: Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocyte during wound healing. *J. Exp. Med.* 176: 1375-1379, 1992.
- Bugge TH, Flick MJ, Daugherty CC, Degen JL: Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction. *Genes Dev.* 9(7): 794-807, 1995.
- Bussolino F, Mantovani A, Persico G: Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem. Sci.* 22(7): 251-256, 1997.
- Cao Y: Endogenous angiogenesis inhibitors: Angiostatin, endostatin, and other proteolytic fragments. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 20: 161-176, 1998.
- Cao Y, Chen A, An SSA, Ji RW, Davidson D, Llinas M: Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth. *J. Biol. Chem.* 272(36): 22924-22928, 1997.
- Cao Y, Ji RW, Davidson D, Schaller J, Marti D, Sohndel S, McCance SG, O'Reilly MS, Llinas M, Folkman J: Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271(46): 29461-29467, 1996.
- Cao Y, O'Reilly MS, Marshall B, Flynn E, Ji R-W, Folkman J: Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. *J. Clin. Invest.* 101(5): 1055-1063, 1998.
- Chen C, Parangi S, Tolentino MJ, Folkman J: A strategy to discover circulating angiogenesis inhibitors generated by human tumors. *Cancer Res.* 55(19): 4230-4233, 1995.

Chen SH, Shine HD, Goodman JC, Grossman RG, Woo SL: Gene therapy for brain tumors: Regression of experimental glioma by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 3054-3057, 1994.

Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, Anand-Apte B, Soker S, Zetter B, O'Reilly M, Folkman J: Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 12; 95(10): 5579-5583, 1998.

Clement B, Musso O, Lietard J, Theret N: Homeostatic control of angiogenesis: A newly identified function of the liver? *Hepatology* 29(3): 621-623, 1999.

Cohen J: Behind the headlines of endostatin's ups and downs. *Science* 26; 283(5406): 1250-1251, 1999.

Colak A, Goodman JC, Chen SH, Woo SL, Grossman RG, Shine HD: Adenovirus-mediated gene therapy in an experimental spinal cord tumors: Tumoricidal efficacy and functional outcome. *Brain Res.* 691: 76-82, 1995.

Consalvo M, Mullen CA, Modesti A, Musiani P, Allione A, Cavallo F: 5-Fluorocytosine-induced eradication of murine adenocarcinomas engineered to express the cytosine deaminase suicide gene requires host immune competence and leaves an efficient memory. *J. Immunol.* 154: 5302-5312, 1995.

Cotten M, Wagner E, Zatloukal K, Phillips S, Curiel DT, Birnstiel ML: High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase) gene construct using the endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 6094-6098, 1992.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: Robbins Pathologic Basis of Disease. 5<sup>th</sup> edition, W.B. Saunders Company, 1994, pp.1242-1244.

Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, Pierce RA, Shapiro SD: Matrix metalloproteinases generate angiostatin: Effects on neovascularization. *J. Immunol.* 15; 161(12): 6845-6852, 1998.

- Cukor G, Blacklow NR, Hoggon D, Berns KI: Biology of adeno-associated virus. In: Parvoviruses. Edited by Berns KI, New York, Plenum, 1984, pp.33-66.
- Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese R MX: In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256: 1550-1552, 1992.
- Davidson BL, Allen ED, Kozarsky KF, Wilson JM, Roessler BJ: A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nat. Genet.* 3: 219-223, 1993.
- Denekamp J: Review article: Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br. J. Radiol.* 66: 181-196, 1993.
- Dhanabal M, Ramchandran R, Volk R, Stillman IE, Lombardo M, Iruela-Arispe ML, Simons M, Sukhatme VP: Endostatin: Yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1; 59(1): 189-197, 1999.
- Dilber MS, Abedi MR, Christensson B, Bjorkstrand B, Kidder GM, Naus CC, Gahrton G, Smith CI: Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase in vivo. *Cancer Res.* 57: 1523-1528, 1997.
- Ding YH, Javaherian K, Lo KM, Chopra R, Boehm T, Lanciotti J, Harris BA, Li Y, Shapiro R, Hohenester E, Timpl R, Folkman J, Wiley DC: Zinc-dependent dimers observed in crystals of human endostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1; 95(18): 10443-10448, 1998.
- Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ: Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 21; 88(6): 801-810, 1997.
- Dong Z, Yoneda J, Kumar R, Fidler IJ: Angiostatin-mediated suppression of cancer metastases by primary neoplasms engineered to produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 17; 188(4): 755-763, 1998.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 146: 1029-1039, 1995.
- Eck SL, Alavi JB, Alavi A, Davis A, Hackney D, Judy K, Mollman J, Phillips PC,

- Wheeldon EB, Wilson JM: Treatment of advanced CNS malignancies with the recombinant adenovirus HSV-5.010tk. *Hum. Gene Ther.* 7: 1465-1482, 1996.
- Edwards DR and Murphy G: Cancer Proteases--invasion and more. *Nature* 6; 394(6693): 527-528, 1998.
- Elshami AA, Saavedra A, Zhang H, Kucharczuk JC, Spray DC, Fishman GI., Amin KM, Kaiser LR, Albelda SM: Gap junctions play a role in the 'bystander effect' of the herpes simplex virus thymidine kinase/gancyclovir system in vitro. *Gene Ther.* 3: 85-92, 1996.
- Engelhardt JF, Yang Y, Stratford-perricaudet LD, Allen ED, Kozarsky K, Perricaudet M, Yankaskas JR, Wilson JM: Direct gene transfer of human CFTR into human bronchial epithelia of xenografts with E1-deleted adenoviruses. *Nat. Genet.* 4: 27-34, 1993.
- Ezekowitz RAB, Mulliken JB, Folkman J: Interferon alpha-2a for life threatening hamangiomas of infancy. *N. Engl. J. Med.* 326: 1456-1463, 1992.
- Ezzell C: Starving tumors of their lifeblood. *Sci. Am.* 279(4): 33-34, 1998.
- Falcone DJ, Khan KM, Layne T, Fernandes L: Macrophage formation of angiostatin during inflammation. A byproduct of the activation of plasminogen. *J. Biol. Chem.* 20; 273(47): 31480-31485, 1998.
- Fan TP, Jaggar R, Bicknell R: Controlling the vasculature: Angiogenesis, antiangiogenesis and vascular targeting of gene therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 57-66, 1995.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M: Lipofectin: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 7384- 7413, 1987.
- Ferrara N, Houck L, Jakeman L, Leung DW: Molecular and biological properties of the vascular endothelial cell growth factor family of proteins. *Endocr. Rev.* 13: 18-32, 1992.
- Ferrari FK, Xiao X, McCarty D, Samulski RJ: New developments in the generation of Ad-free, high-titer rAAV gene therapy vectors. *Nat. Med.* 3: 1295-1297, 1997.
- Fick J, Barker FG 2nd., Dazin P, Westphale EM, Beyer EC, Israel MA: The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor

cytotoxicity in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 11071-11075, 1995.

Fidler IJ and Ellis LM: The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. Cell 21; 79(2): 185-188, 1994.

Flotte TR and Carter BJ: Adeno-associated virus vectors for gene therapy. Gene Ther. 2: 357-362, 1995.

Folkman J: Tumor angiogenesis: Therapeutic implication. N. Engl. J. Med. 285: 1182-1186, 1971.

Folkman J: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J. Natl. Cancer Inst. 82: 4-6, 1990.

Folkman J: The role of angiogenesis in tumor growth. Semin. Cancer Biol. 3: 65-71, 1992.

Folkman J: Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. N. Engl. J. Med. 333: 1757-1763, 1995.

Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat. Med. 1: 27-31, 1995.

Folkman J: Clinical application of research on angiogenesis. N. Engl. J. Med. 333: 1757-1763, 1995.

Folkman J: Angiogenesis inhibitors generated by tumors. Mol. Med. 1(2): 120-122, 1995.

Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat. Med. 1(1): 27-31, 1995.

Folkman J: Tumor angiogenesis. in: The molecular basis of cancer. edited by Mendelsohn J, Holey PM, Israel MA, Liotta LA, Philadelphia, W.B. Saunders, 1995, pp.206-232.

Folkman J: Fighting cancer by attacking its blood supply. Sci. Am. 275(3): 150-154, 1996.

Folkman J: New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. Eur. J. Cancer 32A(14): 2534-2539, 1997.

- Folkman J: Antiangiogenesis therapy. in: *Cancer: Principles and practice of oncology*. edited by De Vita VT Jr., Hellman S, Rosenberg SA, Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997, pp.3075-3085.
- Folkman J, Cole P, Zimmerman S: Tumor behavior in isolated perfused organs: In vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Ann. Surg.* 164: 491-502, 1966.
- Folkman J and D'Amore PA: Blood vessel formation : What is its molecular basis? *Cell* 87: 1153-1155, 1996.
- Folkman J and Ingber D: Inhibition of angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 3: 89-96, 1992.
- Folkman J and Shing Y: Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 267: 10931-10934, 1992.
- Frank S, Hubner G, Breier, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S: Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J. Biol. Chem.* 270: 12607-12613, 1995.
- Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN: The "bystander effect": Tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* 53: 5274-5283, 1993.
- Freeman SM, Whartenby KA, Freeman JL, Abboud CN, Marrogi AJ: In situ use of suicide genes for cancer therapy. *Semin. Oncol.* 23: 31-45, 1996.
- Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S: Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells [published erratum appears in *Nat Med* 2: 1267, 1996]. *Nat. Med.* 2: 1096-1103, 1996.
- Gastl G, Hermann T, Steurer M, Zmija J, Gusilius E, Unger C, Kraft A: Angiogenesis as a target for tumor treatment. *Oncology* 54:177-184, 1997.
- Gately S, Twardowski P, Stack MS, Cundiff DL, Grella D, Castellino FJ, Enghild J, Kwaan HC, Lee F, Kramer RA, Volpert O, Bouck N, Soff GA: The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 30; 94(20): 10868-10872, 1997.

Gately S, Twardowski P, Stack MS, Patrick M, Boggio L, Cundiff DL, Schnaper HW, Kadison L, Volpert O, Bouck N, Enghild J, Kwaan HC, Soff GA: Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res.* 1; 56(21): 4887-4890, 1996.

Geller AI, Keyomarsi K, Bryan J, Pardee AB: An efficient deletion mutant packaging system for defective herpes simplex virus vectors: Potential applications to human gene therapy and neuronal physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 8950-8954, 1990.

Gibaldi M: Regulating angiogenesis: A new therapeutic strategy. *J. Clin. Pharmacol.* 38(10): 898-903, 1998.

Gorski DH, Mauceri HJ, Salloum RM, Gately S, Hellman S, Beckett MA, Sukhatme VP, Soff GA, Kufe DW, Weichselbaum RR: Potentiation of the antitumor effect of ionizing radiation by brief concomitant exposures to angiostatin. *Cancer Res.* 15; 58(24): 5686-5689, 1998.

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

Griscelli F, Li H, Bennaceur-Griscelli A, Soria J, Opolon P, Soria C, Perricaudet M, Yeh P, Lu H: Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 26; 95(11): 6367-6372, 1998.

Gruber BL, Marchese MJ, Kew R: Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. *Blood* 86: 2488-2493, 1995.

Hanahan D: A flanking attack on cancer. *Nature Med.* 4: 13-14, 1998.

Hanahan D and Folkman J: Pattern and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364, 1996.

Hang J, Kong L, Gu JW, Adair TH: VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 269: H1827-1831, 1995.

Harris AL: Anti-angiogenesis therapy and strategies for integrating it with adjuvant therapy.

Recent Results Cancer Res. 152: 341-352, 1998.

Harris AL: Are angiostatin and endostatin cures for cancer? *Lancet* 351(9116): 1598-1599, 1998.

Healy BP: Shouting 'cure!'--or whispering 'hope'--in a crowded cancer ward. *J. Womens Health* 7(5): 489-490, 1998.

Hermonant PL and Muzyczka N: Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: Transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 6466-6470, 1984.

Heyman RA, Borrelli E, Lesley J, Anderson D, Richman DD, Baird SM, Hyman R, Evans RM: Thymidine kinase obliteration: creation of transgenic mice with controlled immune deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 2698-2702, 1989.

Hirschowitz EA, Ohwada A, Pascal WR, Russi TJ, Crystal RG: In vivo adenovirus-mediated gene transfer of the *Escherichia coli* cytosine deaminase gene to human colon carcinoma-derived tumors induces chemosensitivity to 5-fluorocytosine. *Hum. Gene Ther.* 6: 1055-1063, 1995.

Ho DY and Mocarski ES:  $\beta$ -galactosidase as a marker in the peripheral and neural tissues of the herpes-simplex virus-infected mouse. *Virology* 167: 279-283, 1988.

Hoffman R, Starkey S, Coad J: Wound fluid from venous leg ulcers degrades plasminogen and reduces plasmin generation by keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 111(6): 1140-1144, 1998.

Hu GF: Limited proteolysis of angiogenin by elastase is regulated by plasminogen. *J. Protein Chem.* 16(7): 669-679, 1997.

Huber BR, Austin EA, Richards CA, Davis ST, Good SS: Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: Significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 8302-8306, 1994.

Hunter LA and Samulski RJ: Colocalization of adeno-associated virus rep and capsid proteins in the nuclei of infected cells. *J. Virol.* 66: 3117-324, 1992.

- Im SA, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Liu TJ, Ke LD, Kim JS, Lee HY, Steck PA, Kyritsis AP, Yung WK: Antiangiogenesis treatment for gliomas: transfer of antisense-vascular endothelial growth factor inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 59(4): 895-900, 1999.
- Jendraschak E and Sage EH: Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology. *Semin. Cancer Biol.* 7(3): 139-146, 1996.
- Ji WR, Barrientos LG, Llinas M, Gray H, Villarreal X, DeFord ME, Castellino FJ, Kramer RA, Trail PA: Selective inhibition by kringle 5 of human plasminogen on endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247(2): 414-419, 1998.
- Ji WR, Castellino FJ, Chang Y, Deford ME, Gray H, Villarreal X, Kondri ME, Marti DN, Llinas M, Schaller J, Kramer RA, Trail PA: Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *FASEB J.* 12(15): 1731-1738, 1998.
- Johnson PA, Miyanochara A, Levine F, Cahill T, Friedmann T: Cytotoxicity of a replication defective mutant of herpes simplex virus. *J. Virol.* 66: 2952-2955, 1992.
- Kandel J, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F, Klagsbrun M, Folkman J, Hanahan D: Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 66: 1095-1104, 1991.
- Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Elfenbein DH, Alvira M, Buttrick PM, Leinwand LA: The impact of developmental stage, route of administration and the immune system on adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther.* 1: 395-402, 1994.
- Kerbel RS: A cancer therapy resistant to resistance. *Nature* 390(6658): 335-336, 1997.
- Kirsch M, Strasser J, Allende R, Bello L, Zhang J, Black PM: Angiostatin suppresses malignant glioma growth in vivo. *Cancer Res.* 58(20): 4654-4659, 1998.
- Klauber N, Rohan RM, Flynn E, D'Amato RJ: Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470. *Nat. Med.* 3: 443-446, 1997.

- Kong HL and Crystal RG: Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 90: 273-286, 1998.
- Kost C, Benner K, Stockmann A, Linder D, Preissner KT: Limited plasmin proteolysis of vitronectin. Characterization of the adhesion protein as morpho-regulatory and angiostatin-binding factor. *Eur. J. Biochem.* 236(2): 682-688, 1996.
- Kozarsky KF and Wilson JM: Gene therapy: Adenovirus vectors. *Curr Opin Genet. Dev.* 3: 499-503, 1993.
- Lannutti BJ, Gately ST, Quevedo ME, Soff GA, Paller AS: Human angiostatin inhibits murine hemangioendothelioma tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 57(23): 5277-5280, 1997.
- Le Gal La Salle G, Robert JJ, Berrard S, Ridoux V, Stratford-perricaudet LD, Perricaudet M, Mallet J: An adenovirus vector for gene transfer into neuron and glial cells in the brain. *Science* 259: 988-990, 1993.
- Lee TH, Rhim T, Kim SS: Prothrombin kringle-2 domain has a growth inhibitory activity against basic fibroblast growth factor-stimulated capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273(44): 28805-28812, 1998.
- Lee WH, Yeh MY, Tu YC, Han, SH, Wang YC: Establishment and characterization of a malignant glioma cell line, GBM8401/TSGH, NDMC. *J. Surg. Oncol.* 38: 173-181, 1998.
- Li J, Samulski RJ, Xiao X: Role of highly regulated rep gene expression in adeno-associated virus vector production. *J. Virol.* 71: 5236-5243, 1997.
- Liang SC, Lin SZ, Yu JF, Wu SF, Wang SD, Liu, JC: F344-rnu/rnu athymic rats: Breeding performance and acceptance of subcutaneous and intracranial xenografts at different ages. *Lab. Anim. Sci.* 47: 549-553, 1997.
- Lijnen HR, Ugwu F, Bini A, Collen D: Generation of an angiostatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1 (MMP-3). *Biochemistry* 37(14): 4699-4702, 1998.
- Long L, Rubin R, Baserga R, Brodt P: Loss of the Metastatic phenotype in murine carcinoma cells expressing an antisense RNA to the insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res.* 55: 1006-1009, 1995.

- Lou XJ, Kwan HH, Prionas SD, Yang ZJ, Lawn RM, Fajardo LF: Despite its homology to angiostatin apolipoprotein(a) does not affect angiogenesis. *Exp. Mol. Pathol.* 65(2): 53-63, 1998.
- Lucas R, Holmgren L, Garcia I, Jimenez B, Mandriota SJ, Borlat F, Sim BK, Wu Z, Grau GE, Shing Y, Soff GA, Bouck N, Pepper MS: Multiple forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells. *Blood* 15: 4730-4741, 1998.
- Luo J, Lin J, Paranya G, Bischoff J: Angiostatin upregulates E-selectin in proliferating endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245(3): 906-911, 1998.
- Lusby E, Fife KH, Berns KI: Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J. Virol.* 34: 402-409, 1980.
- Mahaley MS Jr., Mettlin C, Natarajan N, Laws ER Jr., Peace BB: National survey of patterns of care for brain-tumor patients. *J. Neurosurg.* 71: 826-836, 1989.
- Maron A, Gustin T, Le Roux A, Mottet I, Dedieu JF, Brion JP, Demeure R, Perricaudet M, Octave JN: Gene therapy of rat C6 glioma using adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene: Long-term follow-up by magnetic resonance imaging. *Gene Ther.* 3: 315-322, 1996.
- Marshall E: The power of the front page of The New York Times. *Science* 15; 280(5366): 996-997, 1998.
- Mastrangelo MJ, Berd D, Nathan FE, Lattime EC: Gene therapy for human cancer: An assay for clinicians. *Semin. Oncol.* 23: 4-21, 1996.
- Mauceri HJ, Hanna NN, Beckett MA, Gorski DH, Staba MJ, Stellato KA, Bigelow K, Heimann R, Gately S, Dhanabal M, Soff GA, Sukhatme VP, Kufe DW, Weichselbaum RR: Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy. *Nature* 394(6690): 287-291, 1998.
- McGarvey ME, Tulpule A, Cai J, Zheng T, Masood R, Espina B, Arora N, Smith DL, Gill PS: Emerging treatments for epidemic (AIDS-related) Kaposi's sarcoma. *Curr. Opin. Oncol.* 10(5): 413-421, 1998.

McPherson RA, Rosenthal LJ, Rose JA: Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication. *Virology* 147: 217-222, 1985.

Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, Willecke K, Yamasaki H: Bystander effect of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 1831-1835, 1996.

Miller DG, Adam MA, Miller AD: Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Molec. Cell Biol.* 10: 4329-4242, 1990.

Mohle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S: Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 663-668, 1997.

Moolten FL: Tumor chemosensitivity conferred inserted herpes thymidine kinase genes,: Para digm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.* 46: 5276-5281, 1986.

Mooser V, Seabra MC, Abedin M, Landschulz KT, Marcovina S, Hobbs HH: Apolipoprotein(a) kringle 4-containing fragments in human urine. Relationship to plasma levels of lipoprotein(a). *J. Clin. Invest.* 1; 97(3): 858-864, 1996.

Morrison RS and Yahanda AM: Tumor angiogenesis and the role of paracrine mediators. in: *Molecular basis of oncology.* edited by Freireich EJ and Stass SA, Cambridge (MA), Blackwell Science, 1996, pp.163-196.

Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV: Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(6): 2811-2816, 1999.

Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J: Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 99(13): 1726-1732, 1999.

Mulligan RC: The basic science of gene therapy. *Science* 260: 926-932, 1993.

Muzyczka N: Use of AAV as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 158: 97-131, 1992.

Namba H, Iwadate Y, Tagawa M, Kimura M, Shimizu H, Sato Y, Sueyoshi K, Sakiyama S: Evaluation of the bystander effect on experimental brain tumors bearing herpes simplex virus-thymidine kinase gene by serial magnetic resonance imaging. *Hum. Gene Ther.* 7: 1847-1852, 1996.

Nelson NJ: Inhibitors of angiogenesis enter phase III testing. *J. Natl. Cancer Inst.* 90(13): 960-963, 1998.

Neve RL: Adenovirus vectors enter the brain. *Trends Neurosci.* 16: 251-253, 1993.

Nguyen JT, Wu P, Clouse ME, Hlatky L, Terwilliger EF: Adeno-associated virus-mediated delivery of antiangiogenic factors as an antitumor strategy. *Cancer Res.* 58(24): 5673-5677, 1998.

Ohwada A, Hirschowitz EA, Crystal RG: Regional delivery of an adenovirus vector containing the *Escherichia coli* cytosine deaminase gene to provide local activation of 5-fluorocytosine to suppress the growth of colon carcinoma metastatic to liver. *Hum. Gene Ther.* 7: 1567-1576, 1996.

Olson TA, Mohanraj D, Carson LF, Ramakrishnan S: Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res.* 54: 276-280, 1994.

O'Mahony CA, Albo D, Tuszynski GP, Berger DH: Transforming growth factor-beta 1 inhibits generation of angiostatin by human pancreatic cancer cells. *Surgery* 124(2): 388-393, 1998.

O'Mahony CA, Seidel A, Albo D, Chang H, Tuszynski GP, Berger DH: Angiostatin generation by human pancreatic cancer. *J. Surg. Res.* 77(1): 55-58, 1998.

Oppenheim J and Fujiwara H: The role of cytokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7(3): 279-288, 1996.

O'Reilly MS: Angiostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS.* 79: 273-294, 1997.

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J: Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88(2): 277-85, 1997.

- O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J: Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat. Med.* 2(6): 689-92, 1996.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Cao Y, Moses M, Lane WS, Sage EH, Folkman J: Angiostatin: A circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 59: 471-482, 1994.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J: Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79(2): 315-328, 1994.
- Ostrove JM, Leonard J, Weck KE, Rabson AB, Gendelman HE: Activation of the human immuno-deficiency virus herpes simplex virus type I. *J. Virol.* 61: 3726-3732, 1987.
- Parsons-Wingerter P, Lwai B, Yang MC, Elliott KE, Milaninia A, Redlitz A, Clark JJ, Sage EH: A novel assay of angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane: Stimulation by bFGF and inhibition by angiostatin according to fractal dimension and grid intersection. *Microvasc. Res.* 55(3): 201-214, 1998.
- Patterson BC and Sang QA: Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J. Biol. Chem.* 272(46): 28823-28825, 1997.
- Perez-cruet MJ, Trask TW, Chen SH, Goodman JC, Woo SL, Grossman RG, Shine HD: Adenovirus-mediated gene therapy of experimental glioma. *J. Neurosci. Res.* 39: 506-511, 1994.
- Phillips P: Cancer experts offer healthy dose of skepticism toward hype over antiangiogenesis agents. *JAMA.* 279(24): 1936-1937, 1998.
- Phillips HS, Hains J, Leung DW, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum. *Endocrinology* 127: 965-967, 1990.
- Pincus S, Mason PW, Konishi E, Fonseca BA, Shope RE, Rice CM, Paoletti E: Recombinant vaccinia virus producing the prM and E proteins of yellow fever virus protects mice from lethal yellow fever encephalitis. *Virology* 187: 290-297, 1992.

- Pluda JM: Tumor-associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications, and therapeutic strategies. *Semin. Oncol.* 24: 203-218, 1997.
- Pui CH: Recent advances in the biology and treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* 5(4): 292-301, 1998.
- Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, Waterman MJ, Segal M, Lu H, Knebelmann B, Sukhatme VP: Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: Comparison to endostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255(3): 735-739, 1999.
- Rastinejad F, Polverini P, Bouck NP: Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* 56: 345-355, 1989.
- Ravindranath N, Little-Ihrig L, Phillips HS, Ferrara N, Zeleznik AJ: Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology* 131: 254-260, 1992.
- Recchia A, Parks RJ, Lamartina S, Toniatti C, Pieroni L, Palombo F, Ciliberto G, Graham FL, Cortese R, La Monica N, Colloca S: Site-specific integration mediated by a hybrid adenovirus/adeno-associated virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(6):2615-2620, 1999.
- Redlitz A, Daum G, Sage EH: Angiostatin diminishes activation of the mitogen-activated protein kinases ERK-1 and ERK-2 in human dermal microvascular endothelial cells. *J. Vasc. Res.* 36(1): 28-34, 1999.
- Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA: Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB. J.* 6: 886-892, 1992.
- Rivas MJ, Arai S, Furutani M, Harada T, Mizumoto M, Nishiyama H, Fujita J, Imamura M: Expression of human macrophage metalloelastase gene in hepatocellular carcinoma: Correlation with angiostatin generation and its clinical significance. *Hepatology* 28(4): 986-993, 1998.
- Rizzuto G, Gorgoni B, Cappelletti M, Lazzaro D, Gloaguen I, Poli V, Sgura A, Cimini D, Ciliberto G, Cortese R, Fattori E: Development of animal models for adeno-associated virus site-specific integration. *J. Virol.* 73: 2517-2526, 1999.

Roemer K and Friedman T: Concepts and strategies for gene therapy. *Eur. J. Biochem.* 208: 211-225, 1992.

Rolling F and Samulski: AAV as a viral vector for human gene therapy: Generation of recombinant virus. *Mol. Biotechnol.* 3: 9-15, 1995.

Rowe PM: Starve the tumour, save the patient. *Lancet* 349(9045): 108, 1997.

Rowe PM: What is all the hullabaloo about endostatin? *Lancet* 353(9154): 732, 1999.

Salmon S: Scientists, media should not overstate 'breakthroughs'. *Ann. Oncol.* 9(8): 794-795, 1998.

Samulski RJ: Adeno-associated virus: Integration at a specific chromosomal locus. *Curr. Opin. Genet. Devel.* 3: 74-80, 1993.

Sang QX: Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res.* 8(3): 171-177, 1998.

Saphir A: Angiogenesis: The unifying concept in cancer? *J. Natl. Cancer Inst.* 89(22): 1658-1659, 1997.

Sasaki T, Fukai N, Mann K, Gohring W, Olsen BR: Timpl RStructure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO. J.* 17(15): 4249-4256, 1998.

Sato TN: A new approach to fighting cancer? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(11): 5843-5844, 1998.

Schuppan D, Cramer T, Bauer M, Strefeld T, Hahn EG, Herbst H: Hepatocytes as a source of collagen type XVIII endostatin. *Lancet* 352(9131): 879-880, 1998.

Sckell A, Safabakhsh N, Dellian M, Jain RK: Primary tumor size-dependent inhibition of angiogenesis at a secondary site: An intravital microscopic study in mice. *Cancer Res.* 58(24): 5866-5869, 1998.

Scott PA and Harris AL: Current approaches to targeting cancer using antiangiogenesis therapies. *Cancer Treat Rev.* 20: 393-412, 1994.

- Shanahan F and O'Sullivan GC: Angiostatin: Candidate for molecule of the year! *Gastroenterology* 108(6): 1946-1948, 1995.
- Sharpe RJ, Byer HR, Scott, CF, Baue SI, Maione TE: Growth inhibition of murine melanoma and human colon carcinoma by recombinant human okatelet factor 4. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:848-853, 1990.
- Shinoura N, Chen L, Wani MA, Kim YG, Larson JJ, Warnick RE, Simon M, Menon AG, Bi WL, Strambrook PJ: Protein and messenger RNA expression of connexin43 in astrocytomas: Implication in brain tumor gene therapy. *J. Neurosurg.* 84: 839-845, 1996.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-845, 1992.
- Sim BK, O'Reilly MS, Liang H, Fortier AH, He W, Madsen JW, Lapceovich R, Nacy CA: A recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. *Cancer Res.* 57(7): 1329-1334, 1997.
- Slavkin HC: Toward increased sensitivity and specificity in the treatment of neoplastic diseases. *J. Am. Dent. Assoc.* 129(4): 473-478, 1998.
- Smith AE: Viral vectors in gene therapy. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 807-838, 1995.
- Smythe WR, Hwang HC, Aamin KM, Eck SL, Davidson BL, Wilson JM, Kaiser LR, Albelda SM: Use of recombinant adenovirus to transfer the herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) gene to thoracic neoplasm: An effective in vitro drug sensitization system. *Cancer Res.* 54: 2055-2059, 1994.
- Smythe WR, Hwang HC, Elshami AA, Amin KM, Eck SJ, Davidson BL, Wilson JM, Kaiser LR, Albelda SM: Treatment of experimental human mesothelioma using adenovirus transfer of the herpes simplex thymidine kinase gene. *Ann. Surg.* 222: 78-86, 1995.
- Smythe WR, Kaiser LR, Hwang HC, Amin KM, Pilewski JM, Eck SJ, Wilson JM, Albelda SM: Successful adenovirus-mediated gene transfer in an in vivo model of human malignant mesothelioma. *Ann. Thorac. Surg.* 57: 1395-1401, 1994.
- Stathakis P, Fitzgerald M, Matthias LJ, Chesterman CN, Hogg PJ: Generation of

angiostatin by reduction and proteolysis of plasmin. Catalysis by a plasmin reductase secreted by cultured cells. *J. Biol. Chem.* 272(33): 20641-20645, 1997.

Stathakis P, Lay AJ, Fitzgerald M, Schlieker C, Matthias LJ, Hogg PJ: Angiostatin formation involves disulfide bond reduction and proteolysis in kringle 5 of plasmin. *J. Biol. Chem.* 274(13): 8910-8916, 1999.

Stein CA, Cleary AM, Yakubov L, Lederman S: Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to the third variable loop domain (v3) of human immunodeficiency virus type I gp120. *Antisense. Res. Dev.* 3:19-31, 1993.

Stewart MJ, Plautz GE, Del Buono L, Yang ZY, Xu L, Gao X, Huang L, Nabel GJ: Gene transfer in vivo with DNA-liposome complex: safety and acute toxicity in mice. *Hum. Gene Ther.* 3: 267-275, 1992.

Strydom DJ: The angiogenins. *Cell Mol. Life Sci.* 54(8): 811-824, 1998.

Sturtz FG, Waddell K, Shulok J, Chen X, Caruso M, Sanson M, Sorodgrass HR, Platika D: Variable efficiency of the thymidine kinase/gancyclovir system in human glioblastoma cell lines: Implication for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 8: 1945-1953, 1997.

Szabo S and Sandor Z: The diagnostic and prognostic value of tumor angiogenesis. *Eur. J. Surg. Suppl.* 582: 99-103, 1998.

Tanaka T, Cao Y, Folkman J, Fine HA: Viral vector-targeted antiangiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA. *Cancer Res.* 58: 3362-3369, 1998.

Tanaka T, Manome Y, Wen P, Cao Y, Kufe D, Folkman J: Retroviral and adenoviral mediated transduction of angiostatin cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth [abstract]. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 38:264, 1997.

Tanaka T, Manome Y, Wen P, Kufe DW, Fine HA: Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. *Nat. Med.* 3: 437-442, 1997.

Tatum EL: Molecular biology, nucleic acid and the future of medicine. *Perspect. Biol. Med.* 10:19-32, 1966.

Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF: Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J. Clin. Invest.* 95: 1798-1807, 1995.

Vile R: Cancer therapy. Less blood means more sanguinity. *Curr. Biol.* 5(1): 10-13, 1995.

Voest EE: Inhibitors of angiogenesis in a clinical perspective. *Anticancer Drugs* 7(7): 723-727, 1996.

Wadman M: Cancer 'cure' article stirs up hot debate. *Nature* 393(6681): 104-105, 1998.

Wadman M: Anticancer activity of endostatin redeemed. *Nature* 397(6720): 549, 1999.

Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E Jr., Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, Maccarty CS, Mahaley MS Jr., Mealey J Jr., Owen G, Ransohoff J 2nd., Robertson JT, Shapiro WR, Smith KR Jr., Wilson CB, Strike TA: Randomized comparisons of radiotherapy and nitrsoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N. Engl. J. Med.* 303: 1323-1329, 1980.

Wang Q and Finer MH: Second-generation adenovirus vectors. *Nat. Med.* 2: 714-716, 1996.

Wells WA: Starving cancer into submission. *EntreMed Inc. Chem. Biol.* 5(4): R87-88, 1998.

Wilson JM: Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N. Engl. J. Med.* 334: 1185-1187, 1996.

Wu JK, Cano WG, Meylaert SAG, Qi P, Vrionis F, Cherington V: Bystander tumoricidal effect in the treatment of experimental brain tumors. *Neurosurgery* 35: 1094-1103, 1994.

Wu Z, O'Reilly MS, Folkman J, Shing Y: Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236(3): 651-654, 1997.

Xiao X, Li J, Samulski RJ: Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J. Virol.* 70: 8098-9108, 1996.

Xiao X, Li J, Samulski RJ: Production of high-titer recombinant adeno-associated virus

vectors in the absence of helper adenovirus. *J. Virol.* 72: 2224-2232, 1998.

Xu M, Kumar D, Srinivas S, Detolla LJ, Yu SF, Stass SA: Parenteral gene therapy with p53 inhibits human breast tumors in vivo through a bystander mechanism without evidence of toxicity. *Hum. Gene Ther.* 8: 177-185, 1997.

Zetter BR: Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu. Rev. Med.* 49: 407-424, 1998.