



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 521**

51 Int. Cl.:
C12N 15/86 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99971860 .4**
86 Fecha de presentación : **05.11.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1135513**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.09.2001**

54 Título: **Terapia génica mediante adenovirus.**

30 Prioridad: **06.11.1998 GB 9824437**

73 Titular/es: **Ark Therapeutics Limited**
79 New Cavendish Street
London W1W 6XB, GB

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

72 Inventor/es: **Yla-Herttuala, Seppo;**
Sandmair, Anu-Maaria;
Loimas, Sami y
Vapalahti, Matti

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 273 521 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Terapia génica mediante adenovirus.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al tratamiento de los tumores cerebrales utilizando terapia génica.

Antecedentes de la invención

10 El tratamiento de los gliomas malignos continúa siendo un reto para la medicina y los científicos. La terapia génica con timidina quinasa, utilizando la timidina quinasa del virus del Herpes Simplex (HSVtk), es una de las modalidades de tratamiento más prometedoras, de entre los intentos de cambiar la supervivencia de pacientes de glioma maligno. La terapia génica con HSVtk se basa en la capacidad que tiene la timidina quinasa de catalizar la fosforilación de ganciclovir (GCV). El GCV fosforilado actúa como un análogo tóxico de nucleótido, matando las células diana. Dicho fenómeno se incrementa todavía más mediante un efecto espectador, por el que las células vecinas son también destruidas incluso sin transfección. Se cree que dicho efecto es debido a la liberación de análogos tóxicos de nucleótido de las células transfectadas a las células vecinas mediante uniones comunicantes.

20 Los retrovirus y adenovirus se han utilizado como vectores para la terapia génica. Los dos tipos de vectores tienen ciertas ventajas y limitaciones. Los tumores cerebrales son especialmente adecuados para la transferencia génica mediada por retrovirus, ya que los retrovirus solamente infectan a las células proliferantes, mientras que el tejido cerebral quiescente normal permanece intacto. La eficacia de la transferencia génica de los retrovirus es relativamente baja, pero se podría mejorar mediante la utilización de células empaquetadoras de retrovirus en lugar de virus aislados. Teóricamente, el tiempo de transducción se podría prolongar e incrementar el número de células transfectadas. Con los retrovirus, el gen transfectado se incorpora en el genoma de la célula diana y por lo tanto se puede lograr expresión génica a largo plazo. Los gliomas experimentales se han tratado por terapia génica mediada por adenovirus transduciendo células tumorales *in situ* con ADV deficiente en replicación portadores de gen de HSVtk [Perez Cruet *et al.*, *Journal of Neuroscience Research*, 39:508 (1994) y Chen, S.-H. *et al.*, *PNAS*, 91:3054 (1994)].

30 Un adenovirus comprende un gen codificante de la timidina quinasa y medicamentos que lo contienen, son útiles en el tratamiento de una cavidad tumoral cerebral. En particular, la cavidad tumoral se trata a continuación de la administración de ganciclovir o de un compuesto equivalente.

El gen de la timidina quinasa será típicamente el derivado del virus herpes Simplex (HSVtk).

40 Se demuestra que la construcción génica de adenovirus/timidina quinasa es más beneficiosa que la transferencia génica de retrovirus.

Descripción de la invención

45 Se puede utilizar una construcción de la presente invención en el tratamiento de una cavidad tumoral. El tratamiento puede comprender las etapas siguientes:

- (i) administrar un adenovirus que comprende un gen que codifica una timidina quinasa, en la pared de la cavidad tumoral; y
- 50 (ii) administrar un compuesto que forma un compuesto citotóxico cuando se fosforila.

55 El compuesto utilizado en la etapa (ii) puede ser ganciclovir o un derivado del mismo. Este procedimiento se puede utilizar con el fin de tratar cualquier cavidad tumoral, preferentemente una cavidad tumoral cerebral, por ejemplo un glioma maligno. La composición utilizada en la etapa (i) se puede administrar repetidamente, preferentemente en 40 u 80 aplicaciones diferentes.

60 La composición utilizada en la presente invención se formula preferentemente sin la adición de proteínas (aparte de las asociadas al adenovirus). Se cree que esto es preferible a las composiciones en las que se añade albúmina para reducir los efectos de los enzimas degradadores sobre los componentes activos. Preferentemente, la presente composición comprende glicerol como estabilizador.

65 La cantidad de productos activos que se deben administrar a un paciente, en la utilización de la presente invención, la pueden determinar los expertos en la materia, en base a la información proporcionada en la presente memoria y a consideraciones habituales tales como la vía de administración, el trastorno que se debe tratar y su estatus, etc.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención:

Ejemplo

En el presente Ejemplo, se comparó la eficacia y la seguridad de la terapia génica con HSVtk mediada por células empaquetadoras de retrovirus y por adenovirus, en el tratamiento de gliomas malignos. En el ensayo, la terapia génica mediada por células empaquetadoras de retrovirus no mejoró la supervivencia de los pacientes de glioma maligno, en comparación con un grupo control transfectado con lacZ. En todos los pacientes se encontró progresión tumoral de acuerdo con la valoración mediante imágenes de resonancia magnética nuclear (MRI) tres meses después de la resección del tumor y la transferencia génica. Sin embargo, la terapia génica mediada por adenovirus, mejoró significativamente el resultado en los pacientes. Además, en tres de los siete pacientes tratados con adenovirus, la MRI indicó que los tumores permanecieron estables.

Retrovirus y línea celular empaquetadora de retrovirus

Se preparó una línea celular PA317/tk tal como describen Poptani *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 5:101-109 (1998). Brevemente, se subclonó el ADNC de 1,2 kb de HSV1-TK [McKnight, *Nucleic Acid Res.*, 8:5949-5964 (1980)] en el plásmido retrovítico pLXSN [Miller *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:2985-3902 (1986)] para generar el plásmido pLTKSN. La expresión de HSV1-TK está promovida por el LTR 5' del virus del sarcoma murino de Moloney. El vector también contiene un promotor de SV40 interno que controla un gen de resistencia a neomicina (NEO). La línea celular PA317 se transfectó mediante el plásmido pLTKSN utilizando precipitación con fosfato cálcico. La línea celular PA317/3.0D5 (PA317/tk) produjo 10^6 cfu/ml, de retrovirus tal como se determinó mediante ensayo en fibroblastos 209F [Ylä-Herttuala *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 95:2692-2698 (1995)]. Antes de las inyecciones, las células empaquetadoras se expandieron, se tripsinizaron y diluyeron a 10^9 células/10 ml Optimem (Gibco BRL). Se demostró que las células estaban libres de micoplasma, otros contaminantes biológicos y virus silvestres.

Los retrovirus BAG que contienen β -galactosidasa (lacZ) se produjeron en ϕ CRIP. Se produjeron títulos de 6×10^5 cfu/ml y se utilizaron como sobrenadantes de cultivo no concentrados (DMEM, 0,5% NCA, Gibco).

Adenovirus

En los adenovirus HSVtk, el casete de expresión que consiste en el amplificador de citomegalovirus (hCMV) y el elemento promotor -HSV 1-TK- y la señal de poliadenilación del virus de simio 40 (SV40) se subclonaron en el plásmido pAdenogal [Barr *et al.*, *Gene Ther.*, 1:51-58 (1994)] para crear el plásmido pAdCMVTK. El pAdCMVTK linealizado y el ADN adenovítico sub360 [McClane *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 8:739-746 (1997)] se transfectaron a la vez en células 293 (ATCC CRL1573) y se generó adenovirus recombinante AdCMVTK mediante recombinación homóloga. Se purificó el clon de virus mediante tres ciclos de ensayo en placa y a continuación de cada ciclo se confirmó la presencia del casete de expresión TK en el genoma del adenovirus mediante PCR. Se realizó la preparación de AdCMVTK a gran escala en células 293 y se purificó y concentró el homogenizado celular que contiene virus mediante gradientes de CsCl, se dializó y se almacenó a -80°C . El título de virus se determinó mediante ensayo en placas con células 293. La preparación de adenovirus se analizó para determinar la integridad del casete de expresión TK utilizando digestión mediante enzimas de restricción seguida de análisis por transferencia Southern. La ausencia de virus silvestres competentes en la replicación se confirmó mediante ensayos citopáticos con células HeLa (ATCC CCL-2) y A459 (ATCC CC185). La preparación de virus también se ensayó para determinar que estaba libre de contaminantes microbianos y lipopolisacáridos (ensayo Limulus, Sigma).

En lacZ, el ADNc de β -galactosidasa dirigido al núcleo bajo el control del promotor de la β -actina y el amplificador del CMV se clonaron en la región E1, eliminada del genoma del adenovirus, utilizando recombinación homóloga. Los adenovirus se concentraron a un título de 3×10^{10} pfu/ml mediante ultracentrifugación. Los virus purificados se recogieron y dializaron en 5 mM Hepes (pH 7,8) y finalmente en 5 mM Hepes (pH 7,8) con 20% glicerol.

Pacientes

Se trataron quince tumores en 14 pacientes mediante terapia génica con HSVtk. Además, se transfectaron 7 pacientes control con el gen marcador lacZ entre 4 y 5 días antes de la resección. Todos los pacientes tuvieron una calificación Karnofsky superior a 70. La edad media de los pacientes fue de 51 años (comprendida entre 20 y 70 años). El tumor fue recurrente en 13 casos (59%). Todos los pacientes recibieron corticosteroides y medicación antiepiléptica y en los tumores nuevos se utilizó terapia por irradiación.

Operación y transferencia génica

Todos los pacientes sufrieron una craneotomía y resección del tumor. La resección fue lo más radical posible al microscopio. El diagnóstico de los gliomas malignos se confirmó mediante secciones congeladas en el momento de la operación. Después de la resección del tumor, se inyectaron en la cavidad del tumor células empaquetadoras de retrovirus HSVtk (10^9 células/10 ml) o adenovirus (3×10^{10} pfu/ml) en cantidades comprendidas entre 0,1

y 0,3 ml, a una profundidad de 10 mm, mediante entre 30 y 70 inyecciones/paciente. El tratamiento con GCV (5 mg/kg/d) se administró intravenosamente vía la vena subclavia dos veces al día durante 14 días. La medicación comenzó 14 días o 5 días después de la resección del tumor y la transferencia génica en los pacientes de transferencia génica con retrovirus o adenovirus, respectivamente. El gen de la β -galactosidasa se transfirió a 7 pacientes control mediante un catéter que se insertó estereotácticamente en el tumor. El catéter se dejó en el lugar hasta que se resecionó el tumor en la craneotomía. Los vectores de transferencia génica (retrovirus BAG, título 6×10^5 cfu y retrovirus, título comprendido entre 3×10^8 y 3×10^{10} pfu) se inyectaron en el tumor durante tres días consecutivos, seguido de la resección del tumor 1 ó 2 días más adelante. Los pacientes con el gen marcador de β -galactosidasa no se trataron con GCV. Todos los pacientes se trataron de acuerdo con la práctica clínica estándar con radioterapia.

Imagen de resonancia magnética nuclear

Los pacientes tratados mediante HSVtk se siguieron por MRI el primer día post operación, y a las 4, 8 y 12 semanas después de la transferencia génica y a continuación cada segundo mes. Las imágenes de MRI se realizaron en un Magneto Vision 1,5 T (Siemens) y consistieron en secuencias T1-compensadas (580/14/1 = tiempo de repetición/tiempo de eco/adquisición) axiales, de corona y sagitales, también después de un medio de contraste (gadopentetatedimeglumine 0,1 mmol/kg); una secuencia compensada turbo T-2 (5400/99/2) y FLAIR (recuperación de inversión fluidica, TR = 9000, TE = 119, AC = 1). Todas las imágenes se adquirieron en secciones contiguas de 5 mm grosor y en una matriz de 256 x 256. Según MRI el primer día postoperación, la resección quirúrgica se calificó como resección total, cuando se extrajo más del 98% del volumen tumoral; como resección subtotal, cuando se eliminó más del 66% pero menos del 98% del volumen tumoral y como resección parcial cuando se eliminó menos del 66% del tumor. Según la MRI de seguimiento, el comportamiento de los tumores se calificó como: progresivo cuando se produjo incluso la más mínima señal de crecimiento tumoral, estable cuando el estatus del tumor permaneció igual y regresivo cuando el volumen tumoral decreció.

Análisis de sangre, orina y muestras de tejidos

Las muestras de sangre y orina se analizaron utilizando procedimientos de rutina antes de la transferencia génica, en el primer día post operación y semanalmente durante la hospitalización, excepto la cuenta diferencial de leucocitos que se midió cada segundo día durante la medicación con GCV. Los anticuerpos antiviral se midieron antes y dos semanas después de la transferencia génica. Los ensayos de PCR y virus silvestres se realizaron a partir de las muestras de plasma y orina antes de la transferencia génica y los días 3, 5, 7 y 21 después de la transferencia génica.

El diagnóstico histológico se realizó a partir de secciones congeladas en el momento de la operación y se confirmó más adelante mediante secciones parafinadas utilizando tinción con hematoxilina-eosina y GFAP (Boehringer). La actividad proliferadora de los tumores se midió mediante el equipo de tinción Ki67 (Dako). Después de la resección, los tumores transfectados con lacZ se analizaron mediante tinción con X-gal tal como describen Puumalainen *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 9:1769-1774 (1998).

Neuropsicología

Los ensayos neuropsicológicos se realizaron con el fin de determinar las funciones cognitivas y la calidad de vida antes de la operación y cada dos meses después del tratamiento. La evaluación de las funciones de memoria utilizó la Wechsler Memory Scale (WMS), que contiene siete subensayos de las capacidades de memoria a corto plazo, ensayo de aprendizaje asociativo, recuerdo retardado, atención y flexibilidad del procesamiento mental. La calidad de vida se midió de acuerdo con una evaluación estandarizada de los problemas del sueño, cansancio, funciones de la memoria, trastornos somáticos, estado de ánimo, funciones sensoriales y motoras, estrés, actividad, depresión, irritabilidad, ineficacia e incertidumbre. Los pacientes transfectados con lacZ no fueron sujetos a los ensayos neuropsicológicos.

Estadística

El análisis estadístico de los resultados de MRI se realizó mediante el ensayo Kruska Wallis para SPSS. Los resultados de los pacientes se analizaron mediante el ensayo exacto de Fisher para SPSS. Las estadísticas para los análisis de laboratorio y neuropsicológicos se evaluaron mediante Anova para SPSS.

Resultados

La Tabla I muestra los resultados de los experimentos de terapia génica.

Todos los pacientes se trataron mediante la resección del tumor. Se utilizaron células empaquetadoras de retrovirus

(PA317/tk) en 7 pacientes y adenovirus (Adv/tk) en siete pacientes. Un paciente (#) recibió un tratamiento repetido con células PA317/tk para dos tumores diferentes. Seis de los casos fueron tumores nuevos, otros fueron recidivas de operaciones anteriores (op), radio terapia (rd) o quimioterapia (ch). El tumor se encontró localizado en el lóbulo temporal (temp), occipital (occ), frontal (front) o parietal (pariet). (Sin) se refiere al lado derecho y (dx) al lado izquierdo. Los anticuerpos a los virus se midieron en la sangre periférica antes y dos semanas después de la terapia. El diagnóstico se confirmó como glioblastoma (gb) en el 82% de los pacientes, dos pacientes padecieron astrocitoma anaplásico (aa) y dos oligodendroglioma anaplásico (ao). La actividad proliferativa de los tumores se midió mediante tinción inmunohistoquímica con ki67. La identidad de los tumores se confirmó mediante inmunotinción de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP). El resultado se midió en meses y el (*) se refiere a la muerte del paciente. Según la supervivencia, la diferencia entre los pacientes tratados retro- y adenoviralmente fue significativa ($p < 0,05$) mediante el ensayo exacto de Fisher. La primera MRI postoperatoria se realizó entre los días 1 y 2 postoperación después de la resección del tumor y la terapia génica y la segunda MRI postoperatoria se realizó 3 meses más tarde. La resección fue total si se extrajo más del 98% de la masa tumoral, subtotal si la resección fue de entre el 66 y el 98% y parcial si se extrajo menos del 66% del tumor. En la MRI de seguimiento el crecimiento se valoró como progresivo (prog) si hubo la más mínima señal de recrecimiento tumoral. La diferencia en el crecimiento progresivo entre los pacientes tratados con retro- y lentivirus según la MRI fue significativa ($p < 0,05$); ensayo Kruskal Wallis. NA = no analizado.

Las transferencias génicas fueron clínicamente seguras tanto con los vectores retro- como adenovíricos y no produjeron efectos adversos graves. Sin embargo, se incrementaron los ataques epilépticos en dos pacientes que recibieron adenovirus aunque los dos pacientes habían experimentado síntomas epilépticos anteriormente. Una paciente sufrió hemiparálisis parcialmente reversible y afasia como complicación de la resección bifocal frontal del tumor. Ésta recibió terapia génica mediante células empaquetadoras en combinación con la resección tumoral. Dos pacientes tuvieron reacciones de fiebre después de la transferencia génica mediante adenovirus con aperturas ventriculares. La temperatura corporal se elevó hasta los 39°C, pero las reacciones fueron a corto plazo y reversibles sin que quedasen síntomas.

No se observaron alteraciones importantes en las mediciones de rutina de laboratorio. Solamente un paciente tuvo leucopenia leve y reversible sin síntomas durante el tratamiento con GCV. Los anticuerpos a los adenovirus se incrementaron notablemente en 3 de los 7 pacientes tratados con Adv/tk; dos también tuvieron una reacción de fiebre. No se produjeron cambios significativos en las funciones del hígado o riñones. No se detectó una administración sistémica de virus en las muestras de plasma y la orina mediante PCR y ensayos de virus silvestres. Las muestras *postmortem* de un paciente se analizaron mediante PCR, lo que demostró que el tumor y los demás tejidos analizados eran negativos para el transgen 6 meses después de la transferencia génica.

Los resultados de seguimiento por MRI no mostraron ningún efecto o mostraron un efecto muy limitado para la terapia génica mediante células empaquetadoras de retrovirus. Todos los pacientes tuvieron enfermedad progresiva tres meses después de la resección del tumor y terapia génica. Para la terapia génica mediada por adenovirus, los resultados de MRI fueron significativamente mejores ($p < 0,05$) con enfermedad estable en 3 de los 7 pacientes tres meses después del tratamiento.

En comparación con el grupo control tratado con lacZ, la supervivencia de los pacientes en el grupo de retrovirus no mostró ninguna mejora. La diferencia entre los resultados de los pacientes tratados retro- y lentivíricamente fue significativa ($p < 0,05$).

(Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 1

Paciente n°	Edad/ Genero	Dg	Lugar del tumor	Ki67	GF/ AP	Tratamiento anterior	Terapia génica	Virus ab	1° MRI postop.	2° MRI postop.	Supervivencia, meses
1	67/M	gb	Occ dx	20%	+	-	RetrolacZ	rubella	NA	NA	3*
2	37/M	gb	Front sin	20%	+	Op+rad+ch	RetrolacZ	-	NA	NA	10*
3	63/F	gb	Temp dx	25%	+	-	Adv/lacZ	-	NA	NA	7*
4	44/F	ao	Front sin	25%	+	Op+rad	Adv/lacZ	-	NA	NA	5*
5	45/M	gb	Temp sin	40%	+	-	Adv/lacZ	-	NA	NA	12*
6	32/M	ao	Front dx	14%	+	Op+ra+ch	Adv/lacZ	Adeno 64	NA	NA	10*
7	39/F	aa	Temp dx	15%	+	Op+rad	Adv/lacZ	-	NA	NA	11*
8	36/M	gb	Temp sin	15%	+	-	PA317/tk	-	Parcial	Prog	13*
9#	64/M	gb	Occ sin	14%	+	-	PA317/tk	-	Subtotal	Prog	-
10	44/F	gb	Temp dx	15%	+	Op+rad	PA317/tk	-	Subtotal	Prog	7*
11#	65/M	gb	Occ sin	14%	+	Op+rad	PA317/tk	-	Subtotal	Prog	8*
12	45/F	gb	Temp dx	20%	+	Op+rad	PA317/tk	-	Subtotal	Prog	9*
13	70/F	gb	Front sin, multif	25%	+	-	PA317/tk	Adeno 64	Subtotal	Prog	4*
14	20/F	gb	Temp y pariet dx	30%	+	Op+rad	PA317/tk	-	Subtotal	Prog	7*
15	56/M	gb	Temp y pariet dx	25%	+	Op+rad	PA317/tk	-	Subtotal	Prog	4*
16	49/F	gb	Temp dx	10%	+	Op+rad	Adv/tk	Adeno 64	parcial	Prog	12*
17	60/M	gb	Temp dx	20%	+	-	Adv/tk	-	subtotal	Prog	10
18	61/M	gb	Pariet sin	30%	+	-	Adv/tk	Adeno>256	Parcial	Prog	9
19	39/M	aa	Front sin	40%	+	Op+rad	Adv/tk	Adeno 128	Parcial	Estable	8*
20	65/M	gb	Parieto occ dx	20%	+	-	Adv/tk	-	Total	Estable	8
21	59/F	gb	Fronto pariet sin	<1%	+	Op+rad	Adv/tk	-	Subtotal	Estable	7
22	56/M	gb	Pariet sin	20%	+	Op+rad	Adv/tk	-	Subtotal	Prog *	6§

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un adenovirus que presenta un gen funcional de timidina quinasa, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una cavidad tumoral cerebral resultante de la resección de un tumor.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el adenovirus está libre de proteínas aparte de las asociadas naturalmente al adenovirus.
- 10 3. Utilización según las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el gen de la timidina quinasa es el gen de la timidina quinasa del virus del Herpes Simplex.
4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el medicamento comprende un estabilizador.
- 15 5. Utilización según la reivindicación 4, en la que el estabilizador es glicerol.
6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el tumor cerebral es un glioma maligno.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65