(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 286 538**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/19 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **04016403 .0**
(86) Fecha de presentación : **25.08.1994**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1469075**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **20.10.2004**

(54) Título: **Terapia génica para tumores sólidos, papilomas y verrugas.**

(30) Prioridad: **26.08.1993 US 112745**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

(73) Titular/es: **BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE**
One Baylor Plaza
Houston, Texas 77030-3498, US

(72) Inventor/es: **Woo, Savio L.C. y**
Chen, Shu-Hsia

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Terapia génica para tumores sólidos, papilomas y verrugas.

Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente al ámbito de la terapia génica. Más particularmente, la presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de terapia génica para tratar tumores sólidos, papilomas y verrugas, utilizando un vector adenovírico, una combinación de vectores adenovíricos, otros vectores víricos, y sistemas no víricos transportadores de ADN.

Descripción de la técnica relacionada

La introducción directa de genes terapéuticos en células malignas *in vivo* puede proporcionar un tratamiento efectivo de tumores localizados. Varias modalidades de tratamientos nuevos se han intentado recientemente. Por ejemplo, un tratamiento implica proporcionar genes normales supresores tumorales y/o inhibidores de oncogenes activados en células tumorales. Un segundo tratamiento implica la potenciación de la inmunogenicidad de las células tumorales *in vivo* mediante la introducción de genes de citoquina. Un tercer tratamiento implica la introducción de genes que codifican enzimas capaces de conferir a las células tumorales sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos. El gen de la timidina quinasa del virus del herpes simplex (HSV-TK) puede convertir específicamente un análogo nucleósido (ganciclovir) en un intermediario tóxico y provocar la muerte en las células en división. Se ha informado recientemente por Culver *et al* (Science 256:1550-1552,1992) de que después del suministro del gen HSV-TK mediante transducción retrovírica, el tratamiento ulterior con ganciclovir causó de modo efectivo una regresión del tumor cerebral en animales de laboratorio. Una característica atractiva de esta modalidad de tratamiento para tumores localizados es el denominado "efecto transeúnte". En el "efecto transeúnte", las células tumorales que expresan HSV-TK, evitan el desarrollo de las células tumorales adyacentes no transducidas en presencia de ganciclovir. De este modo, no cada célula tumoral tiene que expresar HSV-TK para un tratamiento efectivo del cáncer.

El retrovirus HSV-TK utilizado por Culver *et al*, sin embargo, estaba limitado por un título viral bajo. De esta forma, el tratamiento efectivo de los tumores cerebrales requería la inoculación en los animales de células productoras de virus mas que el aislado vírico en sí mismo. Además, en experimentos previos con ratas singergeneicas tratadas con un retrovirus y ganciclovir, los tumores se necrotizaron y fueron invadidos por macrófagos y linfocitos. En el ejemplo 1, a continuación, se utilizaron ratones atímicos y las células tumorales se destruyeron sin implicación aparente de la respuesta inmune celular.

El documento WO 93 02556 da a conocer vectores retrovirales que codifican proteínas suicidas y citoquinas para el tratamiento del cáncer o de células infectadas víricamente. Asimismo, da a conocer la generación de la combinación de susceptibilidad génica y de células cancerosas transgénicas para genes citoquínicos.

En Y. Haj-Ahmad y F.L. Graham, 1986, J. VIROLOGY, 57:267-274 y en Berkner, KL, 1988, BIOTECHNIQUES, 6:616-629, se dan a conocer vectores adenovirales para el suministro de genes heterólogos tal como el HSV-tk.

Una revisión general de los sistemas de suministros génicos, tal como los vectores adenovíricos, aparece en Mulligan, R.C., 1993, SCIENCE, vol. 260: 926-932.

La técnica anterior sigue mostrándose deficiente en la falta de una técnica terapéutica génica eficiente para el tratamiento de tumores sólidos. La solicitud de patente de la misma familia, EP-A-0719147, se refiere a un vector adenovírico y a la composición para tratar tumores sólidos, papilomas o verrugas en un animal no humano o en un humano.

La presente solicitud divisoinaria se dirige a un sistema de suministro de ADN para la administración de un gen suicida y de una o más genes citoquínicos que se contienen en el ADN para un individuo, para el tratamiento de un tumor sólido, papiloma o verruga en un animal no humano o en un humano, siendo seleccionado dicho sistema de suministro de ADN de entre un vector vírico, un vector episómico, un liposoma, un lípido catiónico o un sistema de suministro no vírico formado por el ADN o el ARN de interés, una porción que reconoce y se une a un receptor superficial celular o a un antígeno, una porción de unión al ADN, y una porción lítica que permite el transporte de un complejo desde la superficie celular al citoplasma; en el que el gen suicida y el o los diversos genes citoquínicos están contenidos en dicho ADN o ARN y pueden expresarse, y en el que el gen suicida está adaptado para codificar una proteína capaz de convertir enzimáticamente *in vivo* un profármaco que se administra a dicho animal o al hombre en un compuesto tóxico.

Otras características y ventajas resultarán evidentes a partir de la descripción siguiente de las formas de realización actualmente preferidas de la invención, que se proporcionan con propósito de exposición cuando se expresan conjuntamente con las figuras adjuntas, en las que:

la Figura 1 muestra una representación esquemática de la construcción de vectores adenovíricos recombinantes que contienen el gen de la timidina quinasa (HSV-TK) del virus del herpes simplex;

la Figura 2 muestra la transducción eficiente *in vitro* de las células C6 del glioma, utilizando un vector adenovírico recombinante que contiene el gen bacteriano de la β-galactosidasa (β-gal). Cuadro A: moi =0; Cuadro B: moi=125; Cuadro C: moi=500 y Cuadro D: moi = 2.000;

la Figura 3 muestra la actividad enzimática de HSV-TK en las células C6 del glioma después de la transducción con un vector adenovírico recombinante que contiene el gen HSV-TK;

la Figura 4 muestra la susceptibilidad a la toxicidad del ganciclovir de las células C6 del glioma transducidas por Ad/RSV-TK *in vitro*;

la Figura 5 muestra la estrategia para la terapia génica de los tumores cerebrales utilizando vectores adenovíricos recombinantes que contienen HSV-TK; y

la Figura 6 muestra una estrategia para la terapia génica de un tumor sólido genérico;

la Figura 7 muestra animales experimentales a los 20 días después de la inoculación de células C6 de glioma en el cerebro, seguido por administración estereotáctica de AD/RSV-TK. El animal que se encuentra a la izquierda fue tratado con PBS y el animal que está a la derecha, con ganciclovir;

la Figura 8 muestra el cerebro entero de ratones tal como se describe en la Fig 7 después de tratamiento con PBS (izquierda) o ganciclovir (derecha);

la Figura 9 muestra un esquema del efecto del tratamiento con ganciclovir y la regresión (MOD) del tumor mamario HSV-TK+;

la Figura 10 muestra el efecto del tratamiento con ganciclovir sobre el tamaño (MOD) del tumor mamario HSV-TK^+;

la Figura 11 muestra un esquema del efecto transeúnte cuando células tumorales mamarias parentales (MOD) y células tumorales que contienen el gen HSV-TK. se mezclaron e inyectaron subcutáneamente en ratones;

la Figura 12 muestra el efecto de PBS o del ganciclovir sobre el tamaño tumoral cuando los ratones se habían tratado con células tumorales 100% parentales, células tumorales que contenían 100% de HSV-TK, 90% de células parentales/10% de células tumorales HSV-TK o 50% de células parentales/50% de células (MOD) tumorales mamarias HSV-TK;

la Figura 13 muestra el efecto de la dosis de ganciclovir sobre el tamaño del tumor cerebral después de la terapia génica mediada por el adenovirus. Se detectaron pequeños tumores residuales en algunos cerebros de ratas tratadas con ADV/tk que recibieron menos de 80 mg/kg de ganciclovir. Barras de error=S.D. Tratamientos, áreas tumorales promedio ± S.D. y tamaños de muestra son: A ADV-tk + PBS, 36,89±6,73 mm^2 (n=3); B ADV-βgal + 150 mg/kg de ganciclovir, 28,75±0,55 mm^2 (n=4); C ADV-tk + 150 mg/kg de ganciclovir, -0 mm(n=2); D ADV-tk + 100 mg/kg de ganciclovir, 0 mm^2 (n= 4) E ADV-tk + 80 mg/kg de ganciclovir, 0 mm^2 (n=2); F ADV-tk+50 mg/kg de ganciclovir, 0,25 ± 0,29 mm^2 (n=4),G ADV-tk + 20 mg/kg de ganciclovir, 1,79 ± 3,52 mm^2 (n=4); H ADV-tk+ 10 mg/kg de ganciclovir, 0,01±0,004 mm^2 (n=4);

la Fig 14 ilustra los resultados de un estudio de supervivencia de animales tratados con ADV-βgal o ADV-tk y entonces 50 mg/kg de ganciclovir dos veces al día durante 6 días. A: animales tratados con ADV-βgal más ganciclovir murieron en un intervalo de 22 días (-; n=7); B: animales en el primer grupo tratados con ADV-tk más ganciclovir permanecieron vivos después de 120 días, excepto un animal que murió después de 98 días por causa desconocida (---; n= 4): C: animales en el segundo grupo tratados con ADV-tk más ganciclovir permanecen vivos después de 80 días (----; n= 5);

la Figura 15 muestra la transducción ADV/RSV-TK de las células cancerosas escamosas humanas HLaC-79 *in vitro*, seguido por el tratamiento de 10 ug/ml de GCV (barras continuas) o PBS (barras rayadas). La supervivencia celular se evaluó 68 horas después de la transducción, tanto en los grupos con tratamiento GCV como en los de control PBS. El tratamiento con GCV dio lugar a una eliminación de las células cancerosas del 85 a 90x a una M.O.I. muy bajo. Los controles no transducidos (M.O.I=0) y los controles PBS no demostraron toxicidad hasta un M.O.I de 25;

la Figura 16 presenta el porcentaje principal de necrosis de los tumores de células escamosas *in vivo,* para cada grupo experimental. Se apreció un efecto citotóxico sustancial (con una necrosis del 41%) después de la transducción adenovírica y del tratamiento con ganciclovir (TK+ C+), comparado con los controles (necrosis de entre el 0 y el 2,2%). Significado estadístico para el análisis de la prueba de la t: $p<0,001$;

la Figura 17 muestra valores de índices tumorales (puntos) que muestran la respuesta clínica total para cada animal en los grupos experimentales. Los datos en o por debajo de la línea horizontal(índice tumoral de 30 o inferior) indican casi una regresión tumoral total. Las barras muestran valores promedio para cada grupo. Se apreció una respuesta clínica espectacular en los animales con tratamiento completo (TK+G+), comparada con cada grupo de control ($p<0,001$-0,02) por el análisis Mann-Whitney);

la Figura 18 muestra la caracterización funcional de los vectores adenovíricos recombinantes: susceptibilidad a GCV de progenies celulares tumorales colónicas MCA-26 transducidas con ADV/RSV-tk. Las células MCA-26 se transdujeron con ADV/RSV-tk con varias multiplicidades infecciosas, seguido por el tratamiento con PBS o 10 ug/ml 12 horas más tarde. A los 3 días, las células viables se determinaron mediante tinción con azul tripan;

la Figura 19 muestra los resultados de un bioensayo IL2 murino de los medios condicionados de células B16 transducidas con ADV/RSV-mIL2. Los medios condicionados se añadieron a una progenie celular T murina CTLL-2 y que se cultivó durante 20 horas. Se añadió la H^3-timidina durante otras 4 horas y las células se recuperaron utilizando un recogedor celular PHD. La H^3-timidina se determinó mediante contaje de centelleo líquido y se muestran las cpm promedio de cultivos por triplicado;

la Figura 20 demuestra tamaños tumorales residuales en animales después de varios tratamientos terapéuticos génicos. Se midieron las máximas áreas de corte transversal de los tumores mediante análisis morfométrico computarizado. El número acumulativo de animales en los 5 grupos de tratamiento de dos experimentos separados fueron 14 (βgal); 8 (mIL2); 7 (βgal + mIL2); 12 (tk) y 10 (tk + mIL2). Las barras de error representan desviaciones estándar en cada grupo de tratamiento;

la Figura 21 muestra la inmunidad sistémica anti tumoral contra estímulos de células tumorales parentales en sitios distales. Las células tumorales se inocularon subcutáneamente en animales de la totalidad de los cinco grupos de tratamiento. se inyectaron $1x10^5$ Células MCA-26 en el costado derecho de los animales un día después del cumplimiento del tratamiento con GCV, y $2x10^8$ de células tumorales mamarias MOD se inyectaron en el costado izquierdo de los animales. Éstas fueron dosis tumorigénicas que darán lugar a tumores visibles de tamaños similares en ratones BALB/c normales después de 7 días. La presencia de tumores subcutáneos en los animales estimulados se apreció visualmente después de una semana. El número de animales estimulados con MCA-26 fue de 6 en cada grupo y los que fueron estimulados con MOD oscilaron entre 2 y 4 por grupo;

la Figura 22 muestra la respuesta de los linfocitos T citotóxicos en los animales, después de varios tratamientos de terapia génica. Se aislaron esplenocitos a partir de los animales en varios grupos de tratamiento, a los 3 días después de que finalizase la administración de GCV. Se estimularon $6x10^6$ esplenocitos *in vitro* mediante el cocultivo con $5x10^5$ células MCA-26 irradiadas, durante 5 días antes de que se llevaran a cabo los ensayos de liberación de ^{51}Cr. El porcentaje de lisis de las células diana MCA-26 antes de la liberación de Cr^{51} se graficó con respecto a varias relaciones de células efectoras/diana. Los datos representan la liberación específica promedio de Cr^{51} a partir de los cultivos por triplicado; y

la Figura 23 muestra el bloqueo *in vitro* de la respuesta CTL utilizando anticuerpos monoclonales contra CD4 o CD8. Los esplenocitos de los animales tratados con ADV/RSV-tk + ADV/RSV-mIL2 se estimularon *in vitro* en la leyenda de la Figura 5A; y las células efectoras se incubaron entonces con varias concentraciones de anticuerpos sin azida sódica, purificados (GKl.5, anticuerpo monoclonal para CD4 o 2.43, anticuerpo monoclonal para $CD8_a$, Pharmingen) a 37ºC durante 30 minutos. El ensayo de liberación de Cr^{51} se llevó a cabo a una relación células efectoras/diana de 50/1;

Los dibujos no están necesariamente a escala. Ciertas características de la invención pueden exagerarse a escala o mostrarse de forma esquemática para unas mayores concisión y claridad.

Descripción detallada de la invención

Resultará evidente para el experto en la materia que pueden introducirse varias sustituciones y modificaciones en la invención que se da a conocer en la presente memoria, sin apartarse del alcance y del espíritu de la invención.

El término "vector" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una construcción compuesta de material genético diseñada para dirigir la transformación de una célula diana. Un vector contiene múltiples elementos genéticos orientados secuencial y posicionalmente, es decir, unidos operativamente con los otros elementos necesarios tales como el ácido nucleico en un casete de ácido nucleico que pueda transcribirse, y cuando sea necesario, traducirse en las células transfectadas. En la presente invención, el vector preferido comprende los elementos siguientes unidos operativamente para la expresión funcional: un promotor, una secuencia conductora 5'ARNm, un sitio de iniciación, un casete de ácido nucleico que contiene la secuencia que va a expresarse, una región 3' no traducida, y una señal de poliadenilación.

El término "transformación estable" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la transformación en la que la secuencia ácido nucleica terapéutica introducida (gen suicida) es, o la secuencia ácido nucleica terapéutica introducida y la secuencia citoquínica son, incorporados en los cromosomas de la célula entera. Esto conduce a un cambio estable evidente o a la transformación de una característica dada de una célula.

El término "transformado" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un procedimiento para llevar a cabo o introducir un cambio estable en las características (fenotipo de expresión) de una célula, mediante el mecanismo de transferencia génica, por el que el ADN o el ARN se introducen en una célula de forma que expresan un producto génico específico o altera a su expresión, o afecta a los productos génicos endógenos. El vector puede introducirse en la célula mediante diversos procedimientos que incluyen la microinyección, la precipitación por $CaPO_4$, la lipofección

(fusión liposómica), utilización de un cañón génico y un vector de ADN transportador. Los adenovirus recombinantes que contienen el gen HSV-TK pueden ser gobernados por varios promotores que incluyen el del citomegalovirus, LTR del virus del sarcoma de Rous, LTR del virus de la leucemia murina, del virus 40 simiano temprano y tardío, y de los genes endógenos HSV-TK. Los adenovirus recombinantes se utilizan para suministrar eficientemente el gen HSV-TK a los tumores. Los vectores adenovíricos presentan varias características biológicas que les hacen más efectivos que el retrovirus para la terapia génica somática de los tumores cerebrales. Los vectores adenovíricos poseen un amplio espectro celular y hospedador; la infección múltiple de células huésped puede producir altos niveles de expresión génica; la infección es episómica, de modo que existe una pequeña posibilidad de que pueda tener lugar la mutación insercional de genes huéspedes; y pueden producirse altos títulos víricos de hasta $1x10^{11}$ partículas /ml.

Una amplia variedad de cánceres, papilomas y verrugas pueden ser tratados mediante la misma estrategia terapéutica. Ejemplos representativos incluyen carcinoma de colon, cáncer prostático, cáncer mamario, cáncer pulmonar, cáncer de piel, cáncer hepático, cáncer óseo, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer cerebral, cáncer de cuello y cabeza, linfoma, y otros tumores sólidos. Ejemplos representativos de papilomas incluyen verrugas genitales, epidermoplastia verruciforme y verrugas malignas.

El término "casete de ácido nucleico" tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere al material genético de interés que puede expresar una proteína, o un péptido, o ARN. El casete ácido nucleico está unido operativamente, es decir, orientado secuencial y posicionalmente en un vector, con otros elementos necesarios, de forma que el ácido nucleico en el casete puede ser transcrito y, cuando sea necesario, traducido.

La presente invención se refiere a un procedimiento para tratar un tumor sólido localizado, papiloma o verruga en un animal o en el hombre, que comprende las etapas de introducir directamente un vector adenovírico en dicho tumor o papiloma, el cual vector comprende los elementos siguientes unidos secuencialmente a una distancia apropiada para la expresión funcional: un promotor, una secuencia conductora 5'ARNm, un sitio de iniciación, un casete de ácido nucleico que contiene la secuencia que va a expresarse, una región 3' no traducida, y una señal de poliadenilación; y administrar un profármaco al animal o al hombre, en el que el profármaco se convierte *in vivo* en un compuesto tóxico.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar tumores sólidos, papilomas o verrugas en un animal o en el hombre, que comprende las etapas que consisten en introducir directamente un vector adenovírico en un tumor sólido, comprendiendo dicho vector los elementos siguientes unidos secuencialmente a distancia apropiada para la expresión funcional: un promotor, una secuencia conductora 5'ARNm, un sitio de iniciación, un casete de ácido nucleico que contiene un gen suicida, una región 3' no traducida, y una señal de poliadenilación; e introduciendo al mismo tiempo un segundo vector adenovírico, que comprende los elementos siguientes unidos secuencialmente a una distancia apropiada para la expresión funcional; un promotor, una secuencia conductora 5'ARNm, un sitio de iniciación, un casete de ácido nucleico que contiene un gen citoquínico, una región 3' no traducida, y una señal de poliadenilación; y administrando un profármaco a un animal o al hombre, en el que el profármaco se convierte *in vivo* en un compuesto tóxico.

Además de los vectores adenovíricos, pueden utilizarse otros sistemas de suministro, virales o no. Un sistema dirigido para formas no virales de ADN o de ARN, requiere cuatro componentes; 1) el ADN o el ARN de interés; 2) una porción que reconozca y se una a un receptor superficial celular o antigénico; 3) una porción de unión al ADN y 4) una porción lítica que permita el transporte del complejo desde la superficie celular al citoplasma. Ejemplos de dichos sistemas de transferencia no vírica pueden encontrarse en Smith y Woo, documento WO 93/18759 registrada el 20 de marzo de 1992. Además, pueden utilizarse liposomas y lípidos catiónicos para suministrar las combinaciones génicas terapéuticas para obtener el mismo efecto. Vectores víricos potenciales incluyen los vectores de expresión derivados de virus tales como el virus de la vacuna, virus herpes, y virus del papiloma bovino. Además, pueden utilizarse vectores episómicos. En la técnica, se conocen otros vectores de ADN y sistemas de transporte. Habitualmente, la forma preferida de realización considera la utilización de un sistema adenovírico.

En el procedimiento de la presente invención, la secuencia ácido nucleica terapéutica o "gen suicida" es un ácido nucleico que codifica un producto que provoca la muerte celular por sí mismo o en presencia de otros compuestos. Un ejemplo representativo de dicho ácido nucleico terapéutico (gen suicida) es el que codifica la timidina quinasa del virus del herpes. Otros ejemplos son la timidina quinasa del virus zoster de la varicela y la citosina desaminasa génica bacteriana que puede convertir la 5-fluorocitosina en el compuesto 5-fluorouracilo muy tóxico.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "profármaco" significa cualquier compuesto que sea útil en los procedimientos de la presente invención y que pueda convertirse en un producto tóxico, es decir, tóxico para las células tumorales. El profármaco se convierte en un producto tóxico mediante el producto génico de la secuencia ácido nucleica terapéutica (gen suicida) en el vector útil en el procedimiento de la presente invención. Ejemplos representativos de dicho profármaco es el ganciclovir, que es convertido *in vivo* en un compuesto tóxico por la HSV-timidina quinasa. El derivado del ganciclovir es tóxico posteriormente para las células tumorales. Otros ejemplos representativos de profármacos incluyen el aciclovir, FlAU [1-(2-desoxi-2-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-5-yodouracilo], la 6-metoxipurina arabinósido para VZV-TK, y la 5-fluorocitosina para la citosina desaminasa.

El ganciclovir puede ser administrado fácilmente por el experto en la materia. El experto en la materia podrá fácilmente determinar la dosis y la vía más apropiadas para la administración del ganciclovir. Preferentemente, el ganciclovir se administra aproximadamente a una dosis de entre 1 y 20 mg/kg de peso corporal. Preferentemente, el

aciclovir se administra a una dosis de entre 1 y 100 mg/día /kg de peso corporal y FlAU se administra a una dosis de entre aproximadamente 1 y 50 mg/día/kg de peso corporal.

En otro procedimiento de la presente invención, un adenovirus que contiene una secuencia génica citoquínica puede ser gobernado por varios promotores, incluyendo la larga repetición terminal del virus del sarcoma de Rous, el promotor citomegalovírico, la LTR del virus de la leucemia murina, los promotores del virus 40 simiano temprano y tardío, y la timidina quinasa del virus del herpes simplex. El adenovirus que contiene el gen citoquínico puede entonces coadministrarse con el adenovirus que contiene el gen suicida, para llevar a cabo una "terapia de combinación génica".

Tal como se utiliza en la presente memoria, "gen de citoquina" significa un gen que codifica una de las sustancias solubles producidas por las células linfoides o no linfoides, caracterizadas por su capacidad para responder a un invasión antigénica. Esto incluye los inferones y los factores implicados en la estimulación de los linfocitos T citolíticos y colaboradores para organizar una respuesta antitumoral efectiva, así como los macrófagos y los monocitos para ayudar en la activación de los linfocitos B para las células productoras de anticuerpos. Los genes de citoquina incluyen la interleucina-1, la interleucina-2, la interleucina-4, la interleucina-6, la interleucina-7, la interleucina-10, la interleucina-12, el interferón-α, el interferón-β, el interferón-δ, los factores de necrosis tumoral α y β, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

Las abreviaturas que se utilizan en la presente memoria incluyen: ADV/RSV-TK, un vector recombinante que contiene el gen de la timidina quinasa gobernado por la larga repetición terminal del virus del sarcoma de Rous; RSV-β-gal, el mismo vector que anteriormente pero que contiene el gen para la β-galactosidasa; TK gen de la timidina quinasa del virus herpes simplex; GCV, ganciclovir; PBS, solución salina fosfotamponada.

Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo de la invención.

Ejemplo 1

Terapia génica para tumores cerebrales: Regresión de gliomas experimentales mediante transferencia génica <u>in vivo</u> mediada por adenovirus

Construcción del vector adenovírico. La construcción de los vectores adenovíricos recombinantes conteniendo el gen de la timidina quinasa (HSV-TK) del virus del herpes simplex (Summers W.C. *et al*, en *PNAS 78* (3), páginas 1441-1445 (1981), se muestra en la Figura 1. Estos distintos vectores se construyeron, cada uno, con un promotor diferente, que se insertó en el extremo 5' de la secuencia codificante y en la señal de poliadenilación del gen HSV-TK: (1) la larga secuencia de repetición terminal del virus del sarcoma de Rous (Ad/RSV-TK): (2) el promotor temprano del gen del citomegalovirus (Ad/CMV-TK), y (3), el promotor del gen de la timidina quinasa del virus del herpes simplex (Ad/HSV-TK).

Transducción de las células C6 del glioma. La transducción de las células C6 del glioma *in vitro* se llevó a cabo utilizando un vector adenovírico recombinante que contenía el gen bacteriano de la β-galactosidasa. Se sembraron $5x10^5$ células C6 sobre pocillos de 1,5 cm de diámetro, transduciéndose con AdV/RSV-β-gal a distintas dosis virales, y tiñéndose con X-gal dos días después. El cuadro A muestra los resultados utilizando una m.o.i. de 0. El cuadro B muestra los resultados utilizando una m.o.i. de 125. El Cuadro C muestra los resultados utilizando una m.o.i. de 500 y el Cuadro D muestra los resultados cuando se utilizó un mol de 2.000.

Transducción de células C6 utilizando el gen HSV-TK. La transducción de las células C6 se llevó asimismo a cabo utilizando un vector adenovírico recombinante que contenía el gen HSV-TK (Ad/RSV-TK). Se sembraron $5x10^5$ células C6 sobre pocillos de 1,5 cm de diámetro, transduciéndose con el vector vírico a distintas dosis virales, tal como se indica. Las células se recuperaron dos días más tarde y se prepararon extractos proteicos. La actividad enzimática de HSV-TK se determinó mediante la fosforilación del H^3-aciclovir tal como se describe en James *et al*., *J. Biol. Chem,* 253 (24); 8721-8727 (1978).

Como puede apreciarse en la Figura 3, la actividad de HSV-TK fue superior en las células C6 después de la transducción con AD/RSV-TK teniendo una M.O.I. de 1.000 y 2.000, respectivamente.

Susceptibilidad al ganciclovir de las células HSV-TK+ C6. La susceptibilidad a la toxicidad del ganciclovir de las células C6 del glioma transducidas por Ad/RSV-TK, se muestra en la Figura 4. Las placas por duplicado de las células transducidas víricamente en la Figura 3, se sometieron al tratamiento con 2 ug/ml de ganciclovir, realizándose el recuento de las células supervivientes a las 72 horas.

La Figura 4 muestra el efecto del ganciclovir en las células C6 después de la transducción con AD/RSV-TK. La Figura 4 muestra que una m.o.i. de 250 produjo una muerte celular del 62,5%, y que una M.O.I. de 500 dio lugar a una muerte celular del 75%. Más intensamente, una m.o.i. de 1.000 dio lugar a una muerte celular del 95% aproximadamente.

Estrategia de la terapia génica. La estrategia para la terapia génica del cáncer cerebral utilizando vectores adenovíricos recombinantes conteniendo HSV-TK se muestra en las Figuras 5 y 6. En la Figura 5, las células C6 del glioma se inyectaron estereotácticamente en el cerebro desnudo de ratones, con un pequeño carboncillo para marcar

el sitio de la inyección. Aproximadamente una semana después, se inyectó Ad/RSV-TK estereotácticamente en el tumor. Los ratones se dividieron entonces en 2 grupos, tratándose uno con ganciclovir durante 6 días y el otro con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los animales se mantuvieron entonces sin tratamiento ulterior hasta que se desarrollaron los tumores, es decir, en alrededor de una a dos semanas.

La Figura 6 muestra inyecciones intraorgánicas de células tumorales en ratones. Después de 4-8 días, los ratones se dividieron en dos grupos. En un grupo, se inyectó AD/*β*-gal en el tumor y en el otro grupo, se inyectó AD/HSV-TK en el tumor, Después de alrededor de 1-2 semanas, la mitad de los ratones en cada grupo se trató con PBS y la otra mitad con ganciclovir. Sólo los ratones tratados con ganciclovir y AD/HSV-TK mostraron regresión tumoral.

Efecto de la inyección de Ad/RSV-TK y de Ganciclovir sobre los tumores cerebrales. Se inocularon animales experimentales con 10^4 células C6 de glioma mediante inyección estereotáctica en el cerebro. Después de 4-8 días, se inyectaron estereotácticamente en el mismo sitio $3x10^8$ partículas del vector adenovírico recombinante, que contenía el gen HSV-TK (Ad/RSV-TK). Doce horas después, los animales se trataron diariamente mediante la administración intraperitoneal con tampón (PBS) o con Ganciclovir (GCV:125 mg/kg) durante 6 días seguidos. Los animales se mantuvieron sin tratamiento ulterior hasta el día 20 a partir del día de la inoculación de las células tumorales, anotándose la aparición de tumores cerebrales para los animales individuales.

La Figura 7 muestra los animales experimentales a los 20 días después de la inoculación de las células C6 del glioma en el cerebro, seguida por la administración estereotáctica de Ad/RSV-TK. En el cuadro izquierdo de la Figura 7 se muestra un animal representativo tratado con PBS con un tumor cerebral obvio, y en el cuadro derecho de la Figura 7, se muestra un ratón representativo tratado con GCV sin un tumor cerebral obvio.

Anatomía macroscópica de los cerebros de ratones con y sin tumor. La Figura 8 muestra cerebros completos de ratones después de tratamiento con PBS (a la izquierda) o con ganciclovir (a la derecha), tal como se describe en el Ejemplo 6. Los cerebros se obtuvieron de animales experimentales a los 20 días después de la inoculación de las células tumorales, tal como se ha descrito anteriormente. La masa tumoral en los ratones tratados con PBS se diseccionó a partir del cerebro y se situó en la parte superior del órgano. Además, a causa de que las células C6 del glioma se inyectaron originariamente en el cerebro de los ratones con un pequeño carboncillo, el cerebro de los ratones tratados con ganciclovir muestra una marca de carboncillo que demuestra el sitio de la inyección de células tumorales.

TABLA I

Tratamiento de tumores cerebrales con un vector adenovírico que posee el gen HSV-TK

TRATAMIENTO	PBS	GCV
Número de animales tratados	4	4
Número de animales con tumor cerebral	4	1

Ejemplo 2

Efecto del ganciclovir en una progenie celular de cáncer mamario

Tratamiento de tumores cancerosos mamarios localizados en ratones. El efecto transeúnte en los tumores sólidos se examinó utilizando una progenie celular cancerosa mamaria (MOD) derivada de los ratones BALB/c. Esta progenie celular forma fácilmente tumores localizados mediante inyección subcutánea de células tumorales en receptores congénicos. Así, esta progenie celular puede utilizarse como un modelo para la terapia génica en el cáncer mamario.

La Figura 9 es un esquema del efecto del tratamiento con ganciclovir y la regresión del tumor con HSV-TK+. La Figura 9 muestra que, en un caso, las células tumorales parentales se inyectaron subcutáneamente en ratones. Los ratones se dividieron en dos grupos. Un grupo se trató con PBS; el otro se trató con GCV durante 5 días. Dos semanas más tarde, los animales se sacrificaron. La Figura 9 muestra asimismo que se inyectó a otro grupo de ratones con células tumorales en las que el gen HSV-TK se había insertado *in vitro* (HSV-TK+). A continuación, los ratones se trataron con PBS o GCV, tal como se ha descrito anteriormente.

La Figura 10 muestra el efecto del tratamiento con ganciclovir en el tamaño tumoral. El cuadro superior muestra que existió una diferencia poco significativa entre el tratamiento con PBS o con GCV en los ratones a los que se inyectó con sólo las células parentales. El cuadro inferior de la Figura 10 muestra que el tratamiento con ganciclovir redujo significativamente el tamaño tumoral cuando el gen HSV-TK se había insertado en las células tumorales antes de la inyección a los ratones.

La Figura 11 muestra un esquema del efecto transeúnte. En el esquema de la Figura 11, las células tumorales parentales y las células tumorales que contenían el gen HSV-TK se mezclaron y se inyectaron subcutáneamente en ratones. Los ratones se trataron entonces con PBS o bien con GCV.

Resultados

Las células MOD transformadas con el gen HSV-TK *in vitro* mostraron una potenciación importante de la sensibilidad a los efectos tóxicos del ganciclovir, con respecto a las células tumorales parentales. Cuando se ensayaron *in vivo*, no sólo el crecimiento de las células MOD transformadas con el gen HSV-TK fue inhibido por la administración intraperitoneal del ganciclovir, sino que los tumores sólidos también experimentaron una regresión en los ratones. La regresión, sin embargo, no se observó con los tumores derivados puramente de las células tumorales parentales. De manera más importante, se observó asimismo un intenso efecto "transeúnte" en las células tumorales mamarias *in vivo*. Cuando a los animales se les coinyectó con las células MOD que expresaban el HSV-TK y con las células tumorales parentales, una cantidad tan pequeña como el 10% de las células que expresaba el HSV-TK fue suficiente para inhibir completamente el desarrollo tumoral en los animales después del tratamiento con ganciclovir (Figura 12). En este conjunto de animales, sin embargo, los tumores experimentaron recurrencia después de entre 30 y 45 días. Por otra parte, los animales que fueron inoculados con el 90% o el 50% delas células TK+ permanecieron libres de tumores durante este período.

La especificidad del tipo celular de la expresión del gen HSV-TK después de la administración del vector adenovírico recombinante en un tumor sólido particular, en un papiloma o en una verruga, puede también obtenerse utilizando promotores específicos tisulares para dirigir la transcripción del gen HSV-TK. Algunos ejemplos de los diversos promotores específicos tisulares se muestran en la Tabla II.

TABLA II

TUMOR	PROMOTORES
hepático	albúmina, alfa-fetoproteína, α_1-antitripsina, transferrina, transtiretina
colon	anhidrasa carbónica I, antígeno carcinoembrionario
ovario placenta	estrógenos, aromatasa citocromo P450, P450 de fragmentación de la cadena lateral del colesterol, 17-alfa-hidroxilasa P450
próstata	antígeno específico prostático, gen gp-91-phox, calicreína específica prostática (jKLK2)
mama, G.I.	erb-B2, erb-B3, β-caseína, β-lacto-globulina, WAB (proteína ácida del suero de leche)
pulmón	proteína C Uroglobina surfactante (cc-10, proteína Cllacell de 10 kd)
piel	k-14-queratina, queratina humana 1 ó 6, loicrina
cerebro	proteína ácida fibrilar glial, proteína específica astrocítica madura, mielina, tirosina-hidroxilasa
páncreas	vilina, glucagon, polipéptido amiloide del islote insulínico (amilina)
tiroides	tiroglobulina, calcitonina
hueso	colágeno alfa 1 (I), osteocalcina, sialoglicoproteína ósea
riñón	renina, fosfatasa alcalina hepática/ósea/renal, eritropoyetina (epo)

Ejemplo 3

Terapia génica de gliomas experimentales mediada por adenovirus

La eficacia de la terapia génica mediada por adenovirus para tratar tumores cerebrales se mostró en un modelo singeneico de glioma. Las células tumorales se transdujeron *in situ* con un adenovirus defectuoso en la replicación (ADV) que transportaba el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simplex (HSV-tk) controlado por el promotor del virus del sarcoma de Rous. La expresión del gen HSV-tk permite a la célula transducida convertir el fármaco ganciclovir a una forma que es citotóxica para las células en división. Los tumores se generaron en 344 ratas Fisher mediante el implante estereotáxico de células 9L del glicosarcoma en el núcleo caudado. Tras ocho días más tarde, los tumores se inyectaron con el ADV que transportaba el gen HSV-tk (ADV-tk) o con un vector ADV control que contenía el gen de la β-galactosidasa (ADV-βgal), tratándose las ratas con ganciclovir o con solución salina. El tamaño tumoral se midió 20 días después de la implantación de las células 9L o cuando murieron. Las ratas tratadas con ADV-βgal y ganciclovir o con ADV-tk y solución salina presentaban grandes tumores. No se detectaron tumores en los animales tratados con ADV-tk y con ganciclovir a dosis $\geq$ 80 mg/kg. Un infiltrado de macrófagos y linfocitos en el sitio de la inyección en los animales tratados con ADV-tk y ganciclovir indicaba una activa reacción inmune local. En estudios de supervivencia, todos los animales tratados con ADV-tk y ganciclovir permanecieron vivos un tiempo superior a 80 días, y hasta 120 días después de la inducción del tumor, mientras que todos los animales no tratados murieron a los 22 días. Estos resultados demuestran que la transferencia mediada por el adenovirus de HSV-tk a las células del glioma *in vivo,* confiere sensibilidad al ganciclovir, y representa un procedimiento para tratar los tumores cerebrales.

Constructos adenovíricos. Se preparó el vector ADV-tk insertando HSV-tk en el plásmido que contenía el promotor de larga repetición terminal del virus del sarcoma de Rous (RSV-LTR) para generar pADL.1/RSV-tk (Chen *et al*, 1994). Se produjo el adenovirus recombinante mediante cotransfección de las células 293 con pADL.1/RSV-tk y un plásmido, pJM17, que contenía el genoma del adenovirus. Las células 293 son células renales humanas transformadas con la región E1 del genoma del adenovirus. Cuando las células 293 se cotransfectaron con pADL.1/RSV-tk y pJM17, se obtuvo un adenovirus defectuoso en la replicación, mediante recombinación homóloga (Graham y Prevec, 1991). Se determinó el título vírico mediante absorbancia óptica a 260 nm. Como vector de control, se utilizó un vector adenovírico defectuoso en la replicación que transportaba el gen de la β-galactosidasa de *E. coli* bajo el control de RSV-LTR (ADV-βgal).

Generación de tumores experimentales. *In vivo,* las células tumorales 9L presentan una morfología que se describe como glioblastoma y sarcoma, o gliosarcoma (Barker *et al*, 1973; Weizaecker *et al*, 1981). Las células 9L del glioma se conservaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina (100 U/ml), y estreptomicina (100 μg/ml) en CO2 al 5% a 37ºC. Las células tumorales se recuperaron para inyección, tratando las células a 37ºC con tripsina al 0,25% en 1,0 mM de ácido tetra acético-etilendiamina durante 5 minutos. Las células se recogieron en DMEM, se lavaron, y se volvieron a suspender en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) a una concentración de $2{,}0\text{x}10^{13}$ células/μl. Las células se contaron con un hemacitómetro antes y después de concentrarlas y antes de la inyección. Después del procedimiento de implante, se ensayó la viabilidad de la preparación celular mediante análisis de exclusión del azul tripán.

Como animales huéspedes se utilizaron ratas hembras adultas 344 Fisher (155-175 gramos), Las ratas se anestesiaron con una inyección intramuscular (0,6 ml/kg) de un anestésico constituido por ketamina (42,8 mg/ml), xilazina (8,6 mg/ml), y acepromacina (1,4 mg/ml), y se situaron en una estructura estereotáxica. Se llevó a cabo una incisión en la línea media en el cuero cabelludo y se realizó un agujero en forma de arandela con una broca de taladro de 0,9 mm, 1,8 mm a la derecha y 2,5 mm anterior al hueso temporal. Utilizando una jeringa de 10 μl dotada con una aguja de calibre 26 y conectadas al brazo que manipulaba la estructura estereotáxica, se inyectaron $1\text{x}10^4$ células 9L de glioma suspendidas en 5 μl de HBSS, en el núcleo caudado derecho a una profundidad de 4,5 mm de la duramadre, con incrementos de 0,2 μl durante 5 minutos. La aguja se dejó en el lugar durante 3 minutos y entonces se retiró lentamente durante otros 3 minutos. El agujero en forma de arandela se cerró con cera ósea y la herida del cuero cabelludo se cerró con grapas. Los tumores tenían $1{,}65 \pm 0{,}094$ mm^2 (n= 4) de diámetro 9 días después de la inyección de las células tumorales, y, si se mantenían intratados, mataron a los huéspedes en un tiempo promedio de 20 días después del implante.

Transducción adenovírica de los tumores experimentales. Ocho días después de la inyección de las células tumorales 9L, se inyectaron ADV-tk o ADV-βgal en los tumores, utilizando las mismas coordenadas que se emplearon para el implante del tumor. Partículas virales ($1{,}2\text{x}10^9$) en 6 μl de 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, glicerol al 10% y 1 mM $MgCl_2$, se inyectaron en 6 sitios en el interior del lecho tumoral. Empezando a una profundidad de 5,5 mm por debajo de la superficie de la duramadre, se inyectó 1 μl de virus, y cuando la aguja alcanzaba 0,5 mm, se inyectó otra vez 1 μl. Esto se repitió hasta que se llevaron a cabo un total de seis inyecciones de 1 μl a través del núcleo tumoral. Los virus se inyectaron durante 5 minutos en cada posición, y entonces, la aguja se retiró lentamente durante 5 minutos. Se situaron partículas de carbono (<30 μm) en el eje de la aguja de inyección para marcar el sitio de ésta. La herida se cerró con grapas.

Tratamiento con ganciclovir de los tumores experimentales. Para demostrar la efectividad de tratamiento con ADV-tk y ganciclovir, en tumores 9L experimentales, se establecieron 3 grupos de tratamiento; 1) ADV-tk más 100 mg/kg de ganciclovir (n=6); 2) ADV-βgal más 100 mg/kg de ganciclovir (n=4); 3) ADV-tk más solución salina (n=7). El tratamiento se inició 12 horas después de la inyección vírica. Los animales recibieron inyecciones intraperitoneales de ganciclovir o de solución salina normal dos veces al día durante 6 días seguidos. Veinte días después de la inyección de las células tumorales o en la muerte, los animales se perfundieron con fijador, se llevaron a cabo secciones en los cerebros y se tiñeron, determinándose morfométricamente el tamaño tumoral.

El efecto de la dosis de ganciclovir sobre la efectividad del tratamiento con ADV-tk se determinó estableciendo 7 grupos experimentales (n=4 para cada grupo) que se sometieron a implantes con células 9L, se trataron con $1{,}2\text{x}10^9$ ADV-tk y se trataron entonces con ganciclovir a dosis de 0, 10, 20, 50, 80, 100 y 150 mg/kg dos veces al día durante 6 días. Veinte días después de la inducción tumoral, los animales se perfundieron con un fijador, se llevaron a cabo secciones en los cerebros y se tiñeron, determinándose el tamaño tumoral.

Para mostrar el efecto del tratamiento con ADV-tk y ganciclovir en la supervivencia a largo plazo, 17 animales portadores tumorales se trataron con ADV-tk y ganciclovir (50 mg/kg) y 7 animales se trataron con ADV-βgal y ganciclovir (50 mg/kg). Los animales se controlaron diariamente, y si mostraban síntomas de morbilidad o morían, sus cerebros se extrajeron para análisis histológico.

Análisis histológico. Los animales se anestesiaron y fijaron mediante perfusión cardíaca con 100 ml de 10 mM solución salina tamponada de fosfato, pH 7,4 (PBS) que contenía heparina (10 unidades/ml), seguido por 200 ml de paraformaldehído al 4% en PBS. Los cerebros se extrajeron, se pusieron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 24 horas, se crioprotegieron entonces en 21% de sacarosa en PBS durante 24-48 horas a 4ºC, se prepararon en OCT, se congelaron y seccionaron en un criostato. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina o se prepararon para llevar a cabo análisis inmunocitoquímicos. El área máxima del corte transversal tumoral se midió utilizando un software

Bioscan Optimas. Los valores tumorales promedio se compararon utilizando el análisis estadístico ANOVA. La tinción inmunocitoquímica se llevó a cabo utilizando el anticuerpo anti-macrófagos ED1 (Dijkstra *et al*., 1985; Polman *et al*., 1986; diluido de 1 a 500 sobre cortes de 40 μm.

Resultados

Efecto de la terapia del gen ADV sobre los gliomas experimentales. Cuando los tumores se trataron con ADV-βgal y ganciclovir (100 mg/kg) o con ADV-tk y solución salina, los grandes tumores se encontraban en todos los cerebros 20 días después de la inyección de las células tumorales. Los tumores se caracterizaron por hipercelularidad, pleomorfismo nuclear, y mitosis sin infiltración celular inflamatoria. Los tumores estaban generalmente bien circunscritos y provocaron comprensión del tejido cerebral adyacente. Sin embargo, se apreció una infiltración focal perivascular del glioma en el cerebro adyacente. Contrariamente a esto, no se apreciaron células tumorales en los cerebros de animales que recibieron un tratamiento de ADV-tk y ganciclovir (100 mg/kg): en vez de eso, en el área de inyección tumoral, resultaba evidente la aparición de macrófagos, linfocitos, neutrófilos, necrosis y hemorragia. Aunque en las muestras aparecía dañada la capa celular ependimario intraventricular ipsilateral, no se observaron necrosis, pérdida neuronal, desmielinización, o respuesta inflamatoria más allá de los tumores o de los sitios de inyección.

Efectos dosis-respuesta del tratamiento con Ganciclovir. El análisis morfométrico del tamaño tumoral en los animales tratados con distintas dosis de ganciclovir, mostró que incluso a dosis bajas (10 mg/kg) de ganciclovir, los tratamientos de ADV-tk más ganciclovir tenían efectos significativos (P<0,005) sobre el tamaño tumoral (Fig 13). En los animales tratados con ADV-tk y solución salina y en los animales tratados con ADV-βgal y ganciclovir, se encontraron grandes tumores, mientras que los animales tratados con ADV-tk y ganciclovir con inferiores a 80 a 150 mg/kg no presentaban tumores residuales. Los animales tratados con ganciclovir con dosis menores que 80 mg/kg, presentaban pequeños tumores residuales. Se encontró una reducción significativa (P<0,005) en el tamaño tumoral en los animales tratados con ADV-βgal y 150 mg/kg de ganciclovir, cuando se comparó con los animales tratados con ADV-tk y solución salina. Esto sugiere que el ganciclovir en sí mismo puede mostrar citotoxicidad o efectos inhibitorios sobre el crecimiento tumoral, independientemente de la actividad de la timidina quinasa.

Estudios de supervivencia. Se midió, en dos grupos experimentales y en un grupo de control (Fig 14), la supervivencia a largo plazo de los animales tratados con ADV-βgal o ADV-tk y 50 mg/kg de ganciclovir. Todos los animales de control (n=5) que se trataron con ADV-βgal y ganciclovir murieron en los días posteriores a la inyección tumoral, encontrándose después de la necropsia grandes tumores intracraneales. Tres de los cuatro animales en el primer grupo experimental que fue tratado con ADV-tk y ganciclovir (50 mg/kg), sobrevivieron más de 120 días. Un animal murió a los 98 días. En el cerebro de este animal no se encontraron tumores y en la necropsia no estaba clara ninguna otra causa de muerte. El segundo grupo experimental estaba compuesto por cinco animales, todos tratados con ADV-tk y ganciclovir (50 mg/kg).Todos estos animales sobrevivieron durante 80 días.

Estos experimentos demuestran que la transducción de gliomas experimentales utilizando un vector adenovírico recombinante que transporta HSV-tk, confiere sensibilidad al medicamento citotóxico ganciclovir. Los vectores adenovíricos infectan tanto las células que se dividen como las que no lo hacen, pudiendo infectar una célula múltiples viriones, lo que aumenta el número de copias de los genes recombinantes que se expresan por célula. En este estudio, no se encontraron tumores en animales tratados con ADV-tk y ganciclovir a dosis de 80, 100 y 150 mg/kg a los 20 días después del tratamiento de inyección tumoral, mientras que se encontraron grandes tumores en los animales de control tratados con ADV-tk y solución salina o con ADV-βgal y ganciclovir. Con dosis de ganciclovir de 50 mg/kg y menores, se observaron tumores residuales en algunos animales a los 20 días posteriores a la inyección de células 9L. A pesar de la presencia de tumores residuales en los animales tratados con ADV-tk y 50 mg/kg de ganciclovir, que fueron sacrificados para llevar a cabo estudios histológicos a los 20 días tras el implante, los animales que se trataron utilizando el mismo protocolo en experimentos de supervivencia, sobrevivieron tanto como 120 días. A causa del rápido crecimiento *in vivo* de las células 9L del gliosarcoma implantadas, es dudoso que cualquier célula tumoral residual se encuentre en los superviviente a largo plazo, o si existen, su comportamiento biológico debe modificarse.

Ejemplo 4

Terapia génica mediada por adenovirus para el cáncer de células escamosas de cabeza y cuello en un modelo desnudo de ratón

La transferencia mediada por el adenovirus del gen de la timidina quinasa del herpes, seguido por la administración de ganciclovir, se utilizó para tratar el cáncer de células escamosas humano de cabeza y cuello, que se implantó en el suelo de la boca de ratones desnudos. Los tumores se generaron por inyección transcutánea (mediante aguja) de $6x10^8$ células cancerosas, inyectándose a los 14 días directamente en los tumores 10^{10} partículas de un adenovirus recombinante defectuoso en la replicación que contenía el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simplex (ADV/RSV.TK). Los ratones se trataron a continuación con GCV durante 6 días seguidos, sacrificándose a los 21 días después del implante tumoral. La respuesta clínica al tratamiento se evaluó mediante ordenador. Se llevó a cabo el análisis gráfico morfométrico del área transversal del tumor no necrótico y de la actividad mitósica, calculándose un índice tumoral. El valor del índice promedio tumoral del grupo completo de tratamiento fue de 280 a 2.400 veces más pequeño que los controles que no recibieron el gen terapéutico (p<0,001-0,016), y tres cuartos del grupo de tratamiento mostraban valores de índices tumorales que indicaban una regresión tumoral casi total. Estos resultados demuestran

que utilizando una terapia génica mediada por adenovirus, se consiguió un tratamiento clínicamente efectivo *in vivo* del cáncer de células escamosas humanas.

Construcciones adenovíricas. Se preparó el vector ADV-tk insertando HSV-tk en el plásmido que contenía el promotor de larga repetición terminal del virus del sarcoma de Rous (RSV-LTR) para generar pADL.1/RSV-tk (Chen *et al*., 1994). El adenovirus recombinante se obtuvo cotransfectando las células 293 con pADL.1/RSV-tk y un plásmido, pJM17, que contenía el genoma adenovírico. Las células 293 son células renales humanas transformadas con la región E1 del genoma del adenovirus. Cuando las células 293 se cotransfectaron con pADL.1/RSV-tk y pJM17, se obtuvo un adenovirus defectuoso en la replicación, mediante recombinación homóloga (Graham y Prevec, 1991). Se determinó el título vírico mediante absorbancia óptica a 260 nm. Como vector de control, se utilizó un vector adenovírico defectuoso en la replicación que transportaba el gen de la β-galactosidasa de *E. coli* bajo el control de RSV-LTR (ADV-βgal).

Experimentos in vitro. $5x10^5$ células HLAC-79 se sembraron en placas de cultivo tisular de 1,5 cm de diámetro en medio MEM de Eagle que contenía suero fetal de ternera al 10% con aminoácidos esenciales y vitaminas. Con una confluencia celular del 50% aproximadamente, el vector adenovírico recombinante que contenía el gen bacteriano de la β-galactosidasa (ADV/RSV-β-gal) (Strafford-Perricaudel, *et al*., *J.Clin.Invest. (1992))* se añadió a diversas multiplicidades de infección. Las células transducidas se tiñeron entonces con X-gal 24 horas después de la transducción. Bajo condiciones idénticas, se llevaron a cabo experimentos separados de cultivo celular utilizando el vector ADV/RSV-TK, seguido por tratamiento con PBS o GCV a una concentración de 10 ug/ml. Sesenta y ocho horas después, las células supervivientes se contaron y compararon con las placas de control de PBS.

Experimentos in vivo. Todos los experimentos animales se llevaron a cabo sobre ratones desnudos atímicos (nu/nu) (Harlan Sprague Dawley) utilizando una técnica estéril bajo una campana de flujo laminar. Ratones desnudos de una edad de entre 6 y 10 semanas se anestesiaron intraperitonealmente con 0,5 ml de Avertin a una concentración de 20 mg/ml. Utilizando una jeringa de 100 ul y una aguja con un calibre del 26, se inyectó en el suelo de la boca de los ratones desnudos una solución de 50 ul que contenía $6x10^6$ células escamosas humanas H1AC-79 en solución salina tamponada de Hank. La suspensión celular se inyectó lentamente y profundamente en el músculo miohideo, extrayéndose entonces la aguja sin fugas aparentes. Los animales se mantuvieron entonces en condiciones estándar de albergue durante 14 días.

Para la inyección adenovírica, los ratones desnudos se anestesiaron como anteriormente y se practicó una incisión en la piel del cuello con unas tijeras. Los tumores se expusieron mediante disecciones quirúrgicas cuidadosas, midiéndose el tamaño en tres dimensiones utilizando calibradores. Una jeringa de un microlitro dotada con una aguja de calibre 25, se utilizó entonces para inyectar directamente una solución de 75 ul que contenía $1x10^{10}$ partículas adenovirales de ADV/RSV-TK o de ADV/RSV-βgal. Otro grupo de control recibió sólo 75 ul de solución salina tamponada de fosfato (PBS). El suministro adenovírico actual o de PBS se llevó a cabo con cuatro pases separados de la aguja, dos paralelos al eje largo del tumor y dos perpendiculares a este eje. Las incisiones del cuello se cerraron con seda 4-0 (Ethicon). Después de dieciocho horas de inyecciones virales, los ratones comenzaron tratamientos intraperitoneales de ganciclovir con 100 mg/kg o de PBS al mismo volumen durante seis días. Los ratones sometidos al tratamiento no mostraron cambios en la alimentación o en otras costumbres comportamentales durante el curso del tratamiento con ganciclovir.

Los ratones se sacrificaron 21 días después del implante tumoral original y las lesiones se extirparon cuidadosamente par incluir sólo la masa tumoral residual o necrótica. Las masas tumorales se midieron con calibradores inmediatamente después de la extirpación y entonces se llevaron a cabo repetidas mediciones mediante un segundo examinador independiente, antes de realizar la inclusión para la evaluación histológica. Para los estudios de X-gal, el tumor extirpado se incluyó en O.C.T. y se congeló el precipitado en hielo seco. Se almacenó a -80ºC hasta que se prepararon cortes congelados que se tiñeron con X-gal (Ponder *et al*., *PNAS* (1988). Para todos los otros estudios histológicos, los tejidos se fijaron en formalina tamponada al 10%, se fijaron en parafina, se realizaron cortes seriados de 3 micras, tiñéndose con hematoxilina y eosina. Los cortes histológicos se examinaron por un único individuo (M.R.S) que no conocía los tratamientos particulares del cada animal. La evaluación del grado del tumor, circunscripción, necrosis, fibrosis, respuesta inflamatoria y contajes mitósicos, se llevaron a cabo utilizando un equipo microscópico estándar. Las mediciones morfométricas cuantitativas de las áreas transversales tumorales máximas, el porcentaje de la necrosis tumoral por el área transversal, y las figuras mitósicas por 10 campos de gran aumento, se llevaron a cabo utilizando un analizador de imágenes asistido por un ordenador. El sistema incluye un microscopio Nikon Microphot-FXA, una cámara de color Ikegami 370M de alta resolución, un monitor vídeo de color de alta resolución Sony Triniton, y un ordenador Compudyne 486 con un software optimas Bioscan (Edmonds, WA).

Resultados

Eficiencia de la transducción adenovírica de células HlaC-79 in vitro. Para los experimentos con ADV/RSV β-gal, el 85% de las células cancerosas escamosas humanas se transdujeron con una M.O.I. de 8, tal como se demuestra por la tinción azul positiva de X-gal, y el 100% de las células se transdujeron con una M.O.I. de 16. No existió toxicidad aparente en esta concentración adenovírica y las células cancerosas no mostraron cambios morfológicos comparados con los controles. Para los experimentos ADV/RSV-TK, las transducciones se llevaron a cabo utilizando un intervalo de 0 (control) a 50 M.O.I., seguido por el tratamiento con PBS o GCV en el medio. Una muerte efectiva de células cancerosas en el grupo GCV se obtuvo con una M.O.I muy bajo de 3 sin un aumento de las muertes y sin toxicidad en

el grupo PBS hasta una M.O.I. de 25 (Figura 15). Se apreciaron muertes celulares significativas en cultivos de células cancerosas escamosas transducidas con adenovirus con una M.O.I. de 50 o superior, pero que no estaban sometidas al tratamiento con GCV. Estos hallazgos indican que ADV/RSV-TK es un sistema vectorial eficiente que es efectivo para eliminar células cancerosas escamosas humanas *in vitro* en combinación con GCV.

Regresión de los cánceres de células escamosas humanas después de transducción adenovírica. Después del implante original de $6x10^6$ células tumorales, los ratones mostraron un lento crecimiento tumoral clínico en el suelo de la boca, que se extendía al cuello anterior durante las dos semanas siguientes. No se dieron síntomas de caquexia durante este período, y todos los animales mostraban apariencia saludable durante las inyecciones adenovíricas. Un grupo de control de los animales se sacrificó a las dos semanas, y el examen histopatológico reveló unas células cancerosas escamosas escasamente diferenciadas con muchas figuras mitósicas y sin la formación de queratina o de necrosis. Asimismo, existieron evidencias clínicas e histopatológicas de rodeo de los tejidos blandos, músculos, y de invasión ósea. Un segundo grupo de animales de control desarrolló eventualmente la caquexia y murió después de 36-45 días.

En el experimento clínico, existieron cuatro grupos de control y un grupo de tratamiento completo: (1) inyección intratumoral de PBS más tratamiento con GCV (PBS + G+); (2) ADV/RSV-βgal más PBS (β-gal+ G-); (3) ADV/RSV-βgal más GCV (β-gal + G+); (4) ADV/RSV-TK más PBS (TK+G-); y (5) ADV/RSV-TK más GCV (TK+G+). Los animales experimentales no mostraron síntomas de caquexia o de cambio en los hábitos alimentarios durante el período de tratamiento y todos aparecieron clínicamente sanos en la necropsia. Los tamaños tumorales pretratamiento oscilaron entre 4,36 mm^2 en el área transversal con un promedio de 13,7 mm^2 para todos los grupos y de 16,4 mm^2 para el grupo de tratamiento completo con TK +G+. Las amplias variaciones en el tamaño tumoral están de acuerdo con el único y original informe de este modelo de cáncer (Dinesman *et al*., *Otolaryngol Head Neck Surg*, (1990)).

Los efectos citotóxicos de los tratamientos se evaluaron histológicamente midiendo el porcentaje de necrosis en las masas tumorales utilizando análisis de imágenes asistido por ordenador. Los animales PBS+G+ y β-gal + G- no mostraron necrosis de los tumores, y los grupos TK+G- y β-gal+G+ mostraron sólo áreas focales de necrosis que oscilan entre 0,5 y 5,0% del área transversal promedio. El grupo TK+G+, sin embargo, mostró necrosis sustancial difusa que oscila entre 17 y 72% de la masa tumoral con un valor promedio de 41% que fue estadísticamente distinto de los controles utilizando el análisis de la Prueba-t ($p<0,001$) (Figura 16).

La tinción X-gal de cortes de tumores inyectados con ADV/RSV-Bgal demostró la tinción nuclear positiva del 1 al 10% de las células tumorales en una distribución de acuerdo con las regiones de inyección de la aguja. Pequeñas islas de tumores residuales podrían identificarse en muchos de los animales sometidos al tratamiento completo (TK+G+), aunque el examen microscópico reveló tumores moribundos hinchados o células necróticas individuales en estas áreas. Asimismo, existía una actividad mitósica muy baja o inexistente. Tres muestras tumorales mostraban una obliteración fibrosa marcada con sólo pequeñas islas de células cancerosas moribundas en el interior de tejido fibroso denso. Sólo los dos tumores más voluminosos en el grupo TK+G+ (220 y 324 mm^3 en la transducción) mostraron áreas sustanciales de células tumorales viables después del tratamiento.

Para analizar objetivamente estos hallazgos, se determinó para cada grupo un valor indicial tumoral sobre la respuesta clínica, utilizando una modificación del cálculo del índice de las células cancerosas descrito anteriormente (Caruso *et al*., *PNAS* (1990). El índice tumoral se basó en mediciones morfométricas de la máxima área tumoral transversal multiplicada por la actividad mitósica de la masa tumoral no necrótica y el cambio en el tamaño macroscópico. La mayoría de animales en el grupo TK+G+ tenía un índice tumoral de "30" o inferior, lo que refleja casi una regresión tumoral total con sólo células viables raras que se detectaron en el análisis microscópico (Figura 17). Un valor de "0" tuvo lugar en cuatro animales TK+G+ y se correlaciona no sólo con una ausencia de figuras mitósicas sino también con una falta de células tumorales viales características después del examen histológico. El índice promedio tumoral para el grupo completo de tratamiento (TK + G+) fue entre 10 y 100 veces más pequeño y el valor promedio fue entre 280 y 2.400 veces menor que los valores para los grupos de control que no recibieron el gen TK terapéutico. Cuando se comparó con el grupo TK que no recibió ganciclovir (TK + G-), el grupo de tratamiento TK+G+ presentaba valores promedio y medios indiciarios que eran 6 y 55 veces menores. Utilizando el análisis Mann-Whitney, se determinó el significado estadístico comparando el grupo TK+G+ con cada uno de los controles con valores que estaban comprendidos entre $p<0,001$ y $p<0,02$ (Figura 16).

Efectos locales y sistémicos de la transferencia génica adenovírica y del tratamiento con ganciclovir. Dos de los animales que recibieron ADV/RSV-TK y tratamiento con ganciclovir se seleccionaron al azar y muestras de tejido localizado y órganos distantes se evaluaron con respecto a cualquier anormalidad histológica. Los músculos de alrededor, el tejido blando, y las glándulas salivares en el piso de la boca y de las regiones del cuello, no mostraron evidencias de necrosis, células moribundas, o cambios morfológicos. Los órganos distantes también se recuperaron en la necropsia e incluyeron el intestino delgado, la vejiga, ovarios, bazo, corazón, cerebro, riñones, pulmones e hígado. Todas las muestras eran normales en el examen macroscópico y el análisis histológico no reveló tumores metastásicos, necrosis, fibrosis u otras morfologías anormales. Sobre todo, los tejidos locales y distantes aparecieron normales sin efectos demostrables de adenovirus o del tratamiento con ganciclovir.

Estos experimentos constituyen la primera demostración con éxito de la transferencia génica mediada por un adenovirus que se utiliza para el tratamiento del carcinoma celular escamoso humano de cabeza y cuello en un modelo de ratón desnudo. La efectividad del esquema del tratamiento se muestra por la M.O.I muy baja que es necesaria para

la eliminación *in vitro* y los resultados de los dos índices terapéuticos analizados. La progenie de células cancerosas humanas es altamente susceptible a la transducción mediante el sistema vectorial adenovírico, pues se encontró una eliminación importante (de células cancerosas) con una M.O.I tan baja como 3. La susceptibilidad a la transducción adenovírica se mostrará ventajosa permitiendo que concentraciones más bajas de ADV/RSV-TK se suministren a los tumores, manteniendo mientras una respuesta clínica satisfactoria.

El primer índice terapéutico significa una necrosis tumoral que fue alta para el grupo ADV/RSV-TK más GCV (TK+G+), indicando un sustancial efecto citotóxico en la terapia acoplada. El tratamiento con sólo ganciclovir (PBS +G+) o conjuntamente con el vector g-gal (β-gal+G+) no mostró necrosis tumoral, y dos de los siete tumores que se inyectaron con sólo el vector de la timidina quinasa (TK +G-) mostraron sólo regiones microscópicas de necrosis focal. El grupo experimental restante, con sólo el vector β-gal (βgal+G-), contenía necrosis focal microscópica en cada tumor, lo que estaba de acuerdo con los sitios de la inyección con la aguja. Así, la combinación de la transferencia del gen de la timidina quinasa más ganciclovir es esencial en la erradicación directa tumoral.

El segundo índice terapéutico se basa en análisis morfométricos y características histológicas de los tumores, y se ha denominado índice tumoral. La importancia de este procedimiento de cálculo para el índice tumoral es que proporciona un medio objetivo para evaluar cualquier tumor residual aparente, así como el resultado total del tratamiento, eliminando la parcialidad del examinador para interpretar la histología tumoral. La mayoría de animales en el grupo completo de tratamiento (TK+G+) tuvieron un índice tumoral por debajo de "30", indicando una casi total erradicación tumoral, y cuatro animales tenían valores de "0". Estos hallazgos demuestran un efecto terapéutico definido de la transferencia del gen de la timidina quinasa y del tratamiento con ganciclovir.

Existieron dos valores de intensas respuestas clínicas en el grupo de tratamiento con TK+G+, que provenía de una eliminación tumoral incompleta y de áreas de cáncer viable residual. Después de revisar el gran tamaño del pretratamiento, los volúmenes tumorales para estos animales fueron de 324 y 220 mm^3 comparados con un volumen promedio de 95 mm^3 para los otros tumores en el grupo TK+G+. Estos hallazgos sugieren que existe un volumen crítico tumoral que limita "una vez" la respuesta de la terapia de transferencia génica. Asimismo, existieron dos valores bajos de respuestas clínicas en el grupo de control TK+G-, pero en la revisión histológica no se evidenció necrosis, y el tumor contenía grandes cantidades de figuras mitósicas. Estos dos valores bajos fueron resultado directo del área transversal muy pequeña de los dos tumores, y podría ser simplemente un factor del desarrollo canceroso variable conocido en el modelo (Dinesman *et al*., *Otolaryngol Head Neck Surg*, (1990)). La posibilidad de un efecto inhibitorio sobre el desarrollo tumoral a partir de la transferencia del gen de la timidina quinasa, debe considerarse, sin embargo, ya que los índices tumorales del grupo TK+G- fueron más pequeños que en los animales de control con una transferencia génica adenovírica β-gal y PBS ($p<0{,}010$-$0{,}16$). Los animales de control β-gal+G+ y β-gal+G- no mostraron asimismo diferencias estadísticas en la respuesta tumoral del grupo de control PBS+G+.

Ratones atímicos a los que faltaban las células T (linfocitos CD4+ y CD8+) se seleccionaron en estos experimentos con el fin de eliminar la respuesta inmune celular que se ha implicado como un componente principal de la regresión tumoral después de la transducción viral (Caruso *et al*., *PNAS* (1990), Culver *et al*., *Science* (1992). Estudios previos en la transferencia del gen TK mediada por retrovirus en tumores glioma de rata en animales inmunocompetentes, han mostrado que la infiltración de macrófagos y linfocitos tiene lugar en estos tumores (Culver *et al*, *Science* (1992). Se cree que la reacción inmune potencia la eliminación general de los tumores después de la transferencia viral. En nuestros experimentos, no hubo respuesta celular inmune o inflamatoria en el grupo de tratamiento TK+G o en cualquiera de los grupos de control. Por tanto, la respuesta eliminadora de los tumores proviene directamente de la transferencia génica de la timidina quinasa acoplada con la administración de ganciclovir.

Los hallazgos en los estudios de presentes inventores soportan el concepto de una contribución de lo que se venido en llamar "el efecto transeúnte". Tanto en los modelos tumorales de sarcoma humano como en los murinos, la transferencia de un metabolito tóxico del ganciclovir, presumiblemente una forma fosforilada, mediante las uniones espaciales o por endocitosis de las vesículas apoptósicas de las células tumorales moribundas transducidas viralmente a las células no transducidas próximas, ha llevado a la eliminación de estas células transeúntes. En nuestros experimentos con células cancerosas escamosas *in vivo*, el suministro de ADV/RSV-βgal dio lugar a sólo un 1-10% de transducción, tal como se detecta mediante tinción con X-gal, mientras que la misma cantidad de la inyección vírica con ADV/RSV-TK mostró una eliminación difusa del tumor y necrosis en el grupo experimental. Además, la tinción localizada de β-gal indica que el adenovirus no difunde fácilmente a través del tumor sólido para afectar a las células cancerosas distantes al sitio de suministro. Asimismo, se debe hacer hincapié en que *in vitro* tuvieron lugar eficiencias transductoras similares con una baja multiplicidad infecciosa, tanto para los adenovirus TK como para el β-gal. El grado de eliminación tumoral en este amplio piso de los cánceres escamosos de la boca después de transducción adenovírica, puede tener lugar conjuntamente con algún otro componente, como el efecto transeúnte.

Aunque el ADV/RSV-TK se inyectó directamente en los tumores, alguna fuga tuvo lugar al músculo circundante, a las glándulas salivales, y a los tejidos subcutáneos. Microscópicamente, no hubo necrosis o cambio en la morfología de estos tejidos circundantes normales. Los efectos de la transducción adenovírica TK y de la administración de GCV están, pues, limitados, a las células cancerosas que se están dividiendo activamente. Asimismo, no hubo evidencia de alteraciones sistémicas a partir del régimen de tratamiento, así como la inspección macroscópica y microscópica de los órganos distantes, incluyendo el intestino delgado, la vejiga, ovarios, bazo, corazón, cerebro, riñones, pulmones e hígado, no reveló ningún daño.

Estos experimentos demuestran que puede alcanzarse, utilizando la terapia génica mediada por adenovirus, un tratamiento *in vivo* clínicamente efectivo, del cáncer de células escamosas en un modelo animal.

Ejemplo 5

Terapia génica de combinación para metástasis hepática de carcinoma de colon in vivo

Se investigó la eficacia de la terapia de combinación con un gen suicida y un gen citoquínico para tratar el carcinoma de colon metastásico en el hígado. Los tumores hepáticos se generaron mediante inyección intrahepática de una progenie celular de carcinoma colónico (MGA 26) en ratones BALB singeneicos. Vectores adenovíricos recombinantes que contenían varios genes terapéuticos y de control, se inyectaron directamente en los tumores sólidos, seguido por tratamiento con ganciclovir. Mientras que los tumores seguían desarrollándose en los animales tratados con un vector de control o con un vector de interleucina-2 de rata, los que habían sido tratados con un vector de la timidina quinasa del virus del herpes simplex, con o sin la administración del vector interleucina-2 de la rata, mostraron una necrosis y regresión importantes. Sin embargo, sólo los animales tratados con ambos vectores desarrollaron una inmunidad antitumoral sistémica efectiva contra la estimulación de las dosis tumorigénicas de las células tumorales parentales inoculadas en los sitios distantes. La inmunidad antitumoral se asoció con la presencia de linfocitos T CD8+ citolíticos específicos de los tumores MCA 26. Los resultados sugieren que la combinación de la terapia génica suicida y citoquínica *in vivo* constituye un enfoque poderoso para el tratamiento del carcinoma metastásico de colon en el hígado.

Construcción de vectores adenovíricos recombinantes. La construcción de un vector adenovírico defectuoso en la replicación conteniendo el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simplex, (ADV/RSV-tk), se ha informado previamente (Chen *et al*., *PNAS* (1994). Un vector adenovírico defectuoso en la replicación que contenía el cADN de la interleucina 2 de la rata, (ADV/RSV-mIL2), se construyó de modo similar. La región codificante peptídica de un cADN (mIL2) de la interleucina 2 de la rata, se insertó en un casete de expresión formado por el promotor RSV-LTR y la región de poliadenilacion del gen de la hormona de crecimiento bovina en la estructura vectorial adenovírica E1A (Fang *et al*., *Cancer* Res (1994). El constructo se cotransfectó a las células 293 con pJMI7 ADN, que contiene el genoma adenovírico de complemento. El adenovirus recombinante se aisló mediante purificación de las placas, seguido por centrifugación en doble gradiente de cloruro de cesio. El título vírico (pfu/ml) se determinó mediante ensayo en placa.

Establecimiento y tratamiento del modelo metastásico hepático del carcinoma de colon. El carcinoma metastásico de colon se indujo en el hígado mediante implante intrahepático de las células MCA-26, que es una progenie celular de carcinoma de colon pobremente diferenciada e inducía químicamente, derivada de los ratones BALB/c (Corbett *et al*, *Cancer Research* (1975)). Se expuso el hígado mediante incisión abdominal y $3x10^5$ células MCA-25 se inyectaron en un sitio del extremo del lóbulo hepático lateral izquierdo de ratones singeneicos. Al 7º día, se expuso el hígado mediante incisión abdominal y se midió el tamaño de los tumores. Varios títulos de vectores adenovíricos recombinantes se inyectaron directamente en los tumores hepáticos en 70 μl de 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM $MgCl_2$, glicerol al 10% y 20 μg/ml de polibreno. Doce horas después de la inyección vírica, los animales se trataron intraperitonealmente con ganciclovir (GCV) a 35 mg/kg dos veces al día durante 6 días consecutivos.

Análisis histopatológico y morfométrico de los tumores residuales. Después de diversos tratamientos con terapia génica, se llevó a cabo el análisis morfométrico computarizado de las áreas transversales más grandes de los tumores residuales. El procedimiento de contaje puntual, utilizando un sistema de digitalización asistido por ordenador con software de bloqueo, se seleccionó para el análisis morfométrico, pues las células tumorales viables no siempre eran contiguas. Brevemente, se contaron más de 1.600 puntos predeterminados en la región tumoral. La proporción de células tumorales viables en el nódulo, igualó la suma de los puntos de células tumorales viables divididas por el número total de puntos. El área funcional de las células tumorales viables entre los grupos, se comparó mediante ANOVA.

Estimulación del sitio distante en animales tratados con células tumorales parentales. Un día después del cumplimiento del tratamiento con GCV, que fue 2 semanas después del implante de las células tumorales MCA-26 en el hígado, los animales en todos los grupos de tratamiento se estimularon con dosis tumorigénicas de las células tumorales parentales (MCA-26), así como con una progenie celular tumoral mamaria heteróloga pero singeneica (MOD). $1x10^5$ células MCA-26 se inyectaron subcutáneamente en un sitio único en el costado derecho de los animales, inyectándose $2x10^6$ células MOD en el sitio contralateral. Después de una semana, se desarrollaron en los animales receptores normales tumores subcutáneos viables de tamaños similares, observándose durante 4 semanas la presencia de tumores subcutáneos en los animales después de diversos tratamientos de terapia génica.

Ensayo de linfocitos-T (CTh) citotóxicos. El ensayo CTL se llevó a cabo según procedimientos ya publicados (Coligan *et al*., *Current Protocols in Immunology* (1991). Se aislaron esplenocitos viables de diversos grupos de tratamiento animal 3 días después de la finalización del tratamiento con GCV, que fue 10 días después de la inyección de vectores adenovíricos. Se llevó a cabo una estimulación *in vitro* en placas de 24 pocillos con $6x10^6$ esplenocitos y $5x10^6$ células MCA-26 irradiadas con 15.000 RAD por pocillo, más 20 U/ml de IL-2 murina recombinante. Los ensayos de liberación de ^{51}Cr se llevaron a cabo mezclado diversas cantidades de esplenocitos estimulados, que se recuperaron después de 5 días de cultivo (células efectoras) con 5.000 células MCA-26 (células diana) marcadas con ^{51}Cr, en placas con un fondo en forma de U y con 96 pocillos. Tras 4 horas a 37ºC se extrajeron de cada pocillo

100 μl del medio y se procedió a su contaje en su contador gamma. El porcentaje de lisis se define como [cpm_{exp}-cpm_{min})/cpm_{max}-$cpm_{min)}$ x 100, donde cpm_{max} representa los contajes totales liberados por las células diana lisadas con NP40, y cpm_{min} representa los contajes anteriores liberados espontáneamente por las células diana. Los datos representan cpm de promedio específico de cultivos por triplicado, con SEM inferior al 7% en todos los ensayos.

Resultados

Caracterización funcional de los vectores adenovíricos recombinantes. Para determinar si la introducción del gen HSV-tk convertía en susceptibles a las células tumorales colónicas MCA26 a su eliminación mediante GCV, el vector adenovírico recombinante defectuoso en la replicación ADV/RSV-tk fue utilizado para transducir la progenie celular carcinomatosa colónica *in vitro* (Fig 18). Después de la transducción con el vector recombinante y tratamiento posterior con PBS, las células fueron completamente viables incluso con una multiplicidad de infección ((M.O.I.) de 12.000. Después de un tratamiento posterior con GCV, sin embargo, sólo un 10% aproximadamente de las células fueron viables, con una M.O.I. de 250 y existían pocas células supervivientes con un M.O.I. de 1.000. La funcionalidad del vector adenovírico mIL2 defectuoso en la replicación, (ADV/RSV mIL2) se mostró por la transducción de las células B16 de la rata *in vitro,* seguido por la administración de la actividad mIL2 en el medio condicionado utilizando un ensayo de proliferación de células T (Coligan *et al*, *Current Protocols in Immunology* (1991). Se encontró un nivel alto de actividad mIL2 en el medio condicionado de las células después de transducción con el vector adenovírico mIL2 con una M.O.I. de 500 y 1.000, pero no se detectó actividad mIL2 en las células transducidas con un vector adenovírico de control (fig 19).

Regresión de tumores hepáticos de MCA 26 en animales singeneicos después de la combinación de terapia génica in vivo. Un modelo animal para el carcinoma colónico metastásico en el hígado, fue establecido mediante el implante intrahepático de $3x10^5$ células MCA-26. Tras 6 días, 5x7 mm^2 se encontraban en el hígado del 60-70% de los animales. Este fue el tamaño tumoral seleccionado para todos los experimentos posteriores de terapia génica. Los ratones BALB/c con carcinoma de colon hepático se dividieron en cinco grupos de tratamiento: A: ADV/RSV-βgal; B:ADV/RSV-mIL2; C:ADV/RSV-Bgal+ ADV/RSV-mIL2; D: ADV/RSV-tk y E:ADV/RSV-tk + ADV/RSV-mIL2. Los tumores sólidos residuales en varios grupos de tratamiento animales de midieron y examinaron histopatológicamente. Los animales que se trataron con el vector β-gal tenían grandes nódulos de carcinomas indiferenciados que se desarrollaban activamente con focos raros y pequeños de necrosis espontánea y muchas mitosis. Se advirtió comprensión del hígado adyacente y una inflamación insignificante. Los animales que se trataron con el vector mIL2 mostraban una necrosis subcapsular limitada, pero tenían grandes nódulos compuestos de células tumorales en su mayor parte viables, con una actividad mitósica igual a la de los ratones tratados con el vector βgal. Se encontró un moderado infiltrado inflamatorio de linfocitos, macrófagos y eosinófilos en el borde del tumor. De forma interesante, los animales tratados con una combinación de vectores β-gal y mIL2 presentaban más necrosis tumoral con infiltración de células inflamatorias, pero permaneciendo las células tumorales viables. El grupo de tratamiento con el vector tk presentaba abundante necrosis tumoral, pero células neoplásicas que se replicaban activamente se mostraban numerosas. Todos los animales que se trataron con los vectores tk+mIL2 mostraron una necrosis tumoral masiva rodeada por células inflamatorias. En algunos hígados, no permaneció malignidad viable. La amplia zona de necrosis incluía una mezcla del tumor completamente destruido, hemorragias y daño hepático isquémico. Existían por todas partes numerosos macrófagos, linfocitos y granulocitos. Siete de los 10 animales en el grupo de tratamiento combinatorio tk + mIL2 presentaban algunas células tumorales residuales y los 3 animales restantes aparecieron libres de tumores.

Para cuantificar la efectividad de la terapia génica de combinación tk + mIL2 para causar la regresión tumoral, se llevaron a cabo análisis del contaje puntual morfométrico computarizado del área transversal máxima de corte de los tumores sólidos. Las mediciones resultantes de los tamaños tumorales en los animales de los cinco grupos de tratamiento se muestran en la Figura 20. Todos los animales tratados con el vector β-gal desarrollaron grandes tumores, como se esperaba. En el grupo de animales que fue tratado con sólo el vector mIL2, se encontró una reducción ligera pero no significativa en el tamaño de los rumores residuales. Los animales tratados con los vectores βgal mIL2 conjuntamente y los tratados con sólo el vector tk, mostraron necrosis tumoral y el tamaño de los tumores residuales fue aproximadamente 5 veces menor que los tratados con el vector βgal. En el grupo animal tratado con ambos vectores tk y mIL2, existió una reducción posterior significativa del tamaño de los tumores residuales, cuando se comparó con el grupo animal tratado con sólo el vector tk.

Inmunidad sistémica antitumoral en animales tratados con los vectores tk + mIL2. Para comprobar si existía alguna inmunidad antitumoral en los animales que experimentaron los distintos tratamientos de terapia génica, al finalizar la administración de GCV se llevó a cabo, mediante la inoculación subcutánea de dosis tumorigénicas de las células MCA-26, la protección contra las estimulaciones secundarias. Todos los animales en los grupos de tratamiento con los vectores βgal y tk desarrollaron enormes tumores subcutáneos en los sitios de estimulación después de 7 días. Cinco de los 6 tratados con el vector tk + mIL2 y 4 de los 6 tratados con el vector β-gal + mIL2 también desarrollaron tumores subcutáneos, en el sitio de estimulación. De los animales tratados con el vector 6 tk + mIL.2, sin embargo, ninguno desarrolló tumores subcutáneos incluso después de 4 semanas (Fig 21). La inmunidad antitumoral en estos animales pareció también ser específica para las células MCA-26, pues no se observó, en los mismos animales, protección contra la estimulación del sitio por dosis tumorigénicas de una progenie celular tumoral mamaria heteróloga pero singeneica (MOD) (Fig 21).

Para evaluar críticamente si el rechazo del tumor estaba asociado con la sensibilización de las células huésped efectoras, se llevó a cabo un ensayo T-linfocitos citotóxicos *in vitro*. Se aislaron esplenocitos de animales normales y

de animales en todos los cinco grupos de tratamiento, tres días después de la finalización del tratamiento con GCV, y se cultivaron durante cinco días con células MCA 26 irradiadas. Diversas cantidades de la población celular efectora estimulada se incubaron con células MCA-26 diana marcadas con cromo 51, y el porcentaje de lisis de las células diana se graficó con respecto a las proporciones células efectoras/células diana (Fig 22). No existió una actividad significativa CTL contra las células diana MCA-26 en los esplenocitos de los ratones normales no tratados, así como en los animales en los cuatro primeros grupos de tratamiento. Existió, sin embargo, un aumento importante en la actividad CTL específica de MCA26 en los esplenocitos de los animales tratados con tanto los vectores tk como mIL2 (Fig 22). En contraposición, los esplenocitos de los ratones tratados con tk y mIL2, no lisaron las células tumorales mamarias MOD derivadas de BALB/c o las células diana YACl.

Para determinar si la respuesta CTL reflejaba la actividad de las células T CD8+ y/o CD4+, anticuerpos monoclonales contra CD4 o CD8 se incorporaron como agentes bloqueantes en el ensayo de liberación del cromo 51. El anticuerpo monoclonal contra CD8 fue efectivo en la abolición completa de la respuesta CLT contra las células MCA26, mientras que el anticuerpo monoclonal contra CD4 no fue efectivo (Fig 23). Estos experimentos proporcionaron una evidencia acusada de que las células CD8+ T de los animales tratados con el vector tk + mIL2 eran responsables de la citotoxicidad específica para MCA26.

En este estudio, se descubrió que el suministro directo de los genes HSV-tk e IL2 de la rata en vectores adenovíricos recombinantes al carcinoma metastásico de colon en el hígado, dio lugar a la regresión del carcinoma *in vivo*. Ni el vector β-gal ni el mIL2 solos fueron capaces de detener el crecimiento tumoral en este modelo. El vector tk solo no provocó una necrosis significativa, pero muchas células tumorales viables permanecieron. La terapia de combinación con ambos vectores, tk y mlL.2, resultó no sólo más eficaz para causar la regresión tumoral con una permanencia escasa de células tumorales viables, sino que dio lugar, asimismo, al establecimiento de una inmunidad antitumoral sistémica que protegió de modo efectivo contra dosis tumorigénicas de las células parentales inoculadas en sitios diferentes. La especificidad de esta inmunidad antitumoral contra las células parentales tumorales fue ilustrada además por el hecho de que no existió una inmunidad antitumoral contra dosis tumorigénicas de una progenie celular heteróloga carcinomatosa inoculadas en los mismos animales. Finalmente, se demostró que la inmunidad antitumoral en estos animales estaba asociada con la presencia de linfocitos T CD8+ citotóxicos específicos para las células tumorales MCA26.

De forma interesante, cuando el vector mlL.2 se utilizó en combinación con $3x10^9$ PFU del vector β-gal, se produjo una reducción significativa en los tamaños tumorales asociados con la presencia de células inflamatorias y de necrosis tumoral. Este efecto parece estar asociado con la dosis viral total, pues se obtuvieron asimismo resultados similares en animales tratados con el vector mlL.2 + $3x10^9$ PFU del vector tk sin una subsiguiente administración de GCV. Se sabe que el vector adenovírico recombinante E1A expresa niveles bajos de antígenos virales que pueden provocar una respuesta inmune celular contra células transducidas víricamente *in vivo*, y que esta inmunidad antivírica puede ser potenciada por la expresión local del gen de la interleucina-2. Sin embargo, no se produjo una respuesta CTL sistémica efectiva con respecto a las células tumorales parentales en este grupo de tratamiento, y 4 de 6 animales no mostraron protección contra la estimulación de células tumorales parentales en un sitio distante.

Ejemplo 6

Ensayo de seguridad vectorial en primates no humanos.

Ensayos de toxicidad del tratamiento con el ADV/RSV-tk y GCV en babuínos (Papio cynocephalus). Se obtuvieron virus con un título de $1,6x10^{11}$ partículas/ml, determinadas mediante densidad óptica. El vector se ensayó con respecto a la toxicidad *in vitro* e *in vivo,* ensayos funcionales de tk, competencia para la replicación, y contaminación. Antes de las inyecciones víricas, se llevaron a cabo MRs en todos los babuínos. Muestras previas de suero, esperma, orina y heces se recogieron y ensayaron respecto a adenovirus de tipo salvaje. El suero se ensayó respecto a los anticuerpos neutralizantes para adenovirus de tipo salvaje. Se establecieron tres grupos de tratamiento.

Grupo 1- *Dosis moderada de ADV/RSV-tk, con GCV, supervivencia de 6 semanas*. Una dosis moderada de ADV/RSV-tk ($1,5x10^9$ partículas en 10 ul PBS con glicerol al 10%), se inyectó en el *centrum semiovale* de dos babuínos: una hembra de ciclo menstrual de 16,3 años de edad y de un macho de 17,5 años de edad. Al comienzo del día siguiente, empezaron tratamiento con 10 mg/kg de GCV dos veces al día durante 14 días. Se les tomaron muestras a los 2 y 7 días después de la inyección para análisis de virus y anticuerpos antiadenovíricos. A las 3 semanas después de la inyección vírica los animales, se procesaron sus imágenes mediante MR con potenciación de gadolinio. Aproximadamente 6 semanas después de la inyección vírica se recogieron otra vez muestras de plasma, suero, esperma, orina y heces y se ensayaron para el análisis de virus liberados y respecto a la presencia de anticuerpos para adenovirus, procesándose imágenes cerebrales con potenciación de gadolinio y llevándose a cabo las necropsias de los animales.

El examen macroscópico de los cerebros no mostró anormalidades. Específicamente, no se apreciaron cavidades necróticas, efectos de masa, hemorragias, u opacificación de la subaracnoides. Se tomaron exhaustivamente muestras cerebrales, con respecto a evidencias microscópicas de anormalidades, y tanto en las pequeñas áreas de infiltración de macrófagos como en las linfáticas perivasculares medias, se encontraban infiltrados en el *centrum semiovale* del hemisferio derecho. Más allá de éste, no se encontraban infiltrados, y no existía edema de la sustancia blanca. No apareció leptomeningitis. No se apreciaron necrosis o inclusiones víricas. El plexo coroideo y el epéndimo estaban intactos. No se apreció patología sistémica con excepción de infiltrados linfocíticos hepáticos focales, sin necrosis, en un animal. El examen sistémico en los otros animales fue normal.

Grupo 2- *Dosis altas de ADV/RSV-tk, con GCV, supervivencia de 3 semanas*. Con las especificaciones explícitas de la FDA, se trataron dos babuínos con dosis altas de ADV/RSV-tk y GCV. ADV/RSV-tk ($3x10^{10}$ partículas en 200 μl de PBS con glicerol al 10%) en el *centrum semiovale* de una hembra de babuíno de ciclo menstrual de 16 años de edad y de un macho de 11 años de edad. Al día siguiente, empezaron tratamiento los animales con 10 mg/kg de GCV dos veces al día durante 14 días mediante el sistema tether. A los 2 días y a la semana después de la inyección, se recogieron muestras de plasma, suero, esperma, orina y heces y se ensayaron para el análisis de virus liberados y respecto a la presencia de anticuerpos para adenovirus. Se planeó que si no se encontraban virus, los animales se someterían a procesamiento de imágenes cerebrales con potenciación de gadolinio a aproximadamente 3 semanas después de la inyección vírica y llevándose a cabo las necropsias de los animales al día siguiente. El babuíno macho murió 5 días después de la inyección viral.

Estos animales murieron o se les sometió a eutanasia a los 5 y 10 días después de la inyección del vector y de la iniciación del tratamiento con GCV. En ambos, existió un área de 1,5 a 1,8 cm de necrosis de licuefacción en el sitio de la inyección. Estas masas necróticas ejercieron un efecto másico. El examen histopatológico reveló una inflamación aguda caracterizada por células polimorfonucleares y linfocitos mezclados con necrosis de licuefacción eosinofílica del *centrum semiovale*. Irradiando a partir de la masa tumoral se encontró edema cerebral, evidenciado por espongiosis de la sustancia blanca. Se apreciaron infiltrados perivasculares linfocíticos intensos hasta a partir de 1,5 cm de la cavidad de la inyección en el hemisferio derecho. Se apreció transmuralmente necrosis de coagulación en los vasos adyacentes al sitio de la inyección. En el hemisferio izquierdo, tronco cerebral y cerebelo, se apreciaron raros focos de infiltrado perivascular. Una infiltración multifocal linfocítica subaracnoidea se encontró predominantemente sobre el hemisferio derecho, pero, en grado menor, se encontraba sobre el hemisferio izquierdo y alrededor del tronco cerebral y del cerebelo. No se encontró destrucción del plexo coroideo ni del epéndimo, aunque se apreció inflamación focal del plexo coroideo en el hemisferio derecho en el animal que sobrevivió durante 10 días. No se apreciaron inclusiones intranucleares virales. Los cortes con tinción rápida de azul de Luxol no mostraron pérdidas de mielina, excepto en las cavidades necróticas.

El examen sistémico dio a conocer pulmones congestionados en los animales que murieron el día 5; y el examen microscópico demostró material eosinófilo que rellenaba los espacios alveolares, lo que sugería edema pulmonar neurogénico. No se encontró inflamación pulmonar. Los animales a los que se les practicó la eutanasia a los 10 días, no mostraron patología sistémica.

Grupo 3- *Tratamiento con dosis altas de ADV/RSV-tk, sin tratamiento con GCV, supervivencia de 3 y 5 semanas*. Para diferenciar entre el efecto de la inyección vírica y de la inyección vírica más la administración de GCV, a 2 babuínos machos (con edades de 10,5 y 11,5) se les inyectaron $3x10^{10}$ partículas de ADV/RSV-tk de la misma forma que anteriormente. A estos dos animales no se les trató con GCV. Se tomaron muestras y se analizaron tal como se ha descrito anteriormente. Se llevó a cabo la necropsia en un babuíno a las 3 semanas después de la primera postinyección MR. Al otro babuíno se le practicó la necropsia 6 semanas después del segundo MR. Se analizaron como antes muestras de tejidos y líquidos.

El animal que se examinó a las tres semanas, presentaba una cavidad cística de 1,5 cm en el *centrum semiovale* derecho. En el examen macroscópico no se detectaron efecto de masa, aparición de hernias, o hemorragias. Histopatológicamente, la cavidad estaba rellena con macrófagos que contenían desechos lipídicos. Adyacentes a la cavidad, se detectaron gliosis moderada, inflamación linfocítica persistente, infiltrados linfocíticos perivasculares, y un edema mínimo de la sustancia blanca. No se apreciaron inclusiones víricas, y el plexo coroideo y el epéndimo estaban intactos. Se detectaron focos moderados de conjuntos de linfocitos subaracnoideos sobre el hemisferio derecho, pero no a la izquierda o alrededor del tronco cerebral. No se detectaron alteraciones patológicas sistémicas.

El animal que se examinó a las seis semanas después del tratamiento presentaba una cavidad cística ligeramente irregular de 1,6 cm en el *centrum semiovale* posterior derecho. El tapizado de la cavidad era de un ligero color castaño, no evidenciándose efecto de masa, aparición de hernias o hematomas. El examen microscópico demostró macrófagos repletos de lípidos en el interior de la pared de la cavidad, infiltrado linfocítico persistente en la pared y cerca de alrededor de los vasos sanguíneos e, inmediatamente adyacentes a la cavidad, gliosis y un mínimo edema. No se apreciaron infiltrados del plexo coroideo, del epéndimo o residuales leptomeníngeos. No se encontraron alteraciones patológicas sistémicas.

En resumen, parece constituir un efecto neurotóxico dependiente de la dosis del vector, con los grupos de tratamiento a altas dosis, que presenta necrosis de coagulación en el sitio de la inyección, que, a lo largo del tiempo, es depurado por los macrófagos para producir cavidades císticas. El proceso persiste durante seis semanas, el componente inflamatorio se resuelve en este punto. El GCV parece potenciar la toxicidad clínica del vector a altas dosis, ya que los dos animales que recibieron altas dosis del vector más GCV, murieron o llegaron a estar lo bastante enfermos como para necesitar la eutanasia. Los animales con el vector de dosis moderada más GCV mostraron sólo evidencia microscópica de neurotoxicidad en el sitio de la inyección. El vector adenovírico ejerce efectos citopáticos dependientes de la dosis mediante las proteínas estructurales de pentón estableciendo un paralelismo con el efecto citopático del adenovirus de tipo salvaje. En este experimento, el hecho de que los dos grupos con dosis altas, con y sin GC, presentaran necrosis, mientras que los animales con dosis moderadas, que recibieron GVC, no la presentaran, sugiere fuertemente un efecto citopático directo del vector, más que una toxicidad proveniente de la conversión 6k de BVC a compuestos tóxicos. Este experimento establece un umbral de la dosis para la citopatología de $1,5x10^{9}$ partículas. Las

dosis del vector inferiores a este umbral, asociadas con BVC, es tóxica para dividir las células tumorales, mientras mantiene los constituyentes celulares del CNS (sistema nervioso central) que no se dividen.

Análisis MRI de los cerebros de babuíno tratados con dosis altas y moderadas de ADV/RSV-tk. Las alteraciones neuropatológicas macroscópicas parecen reflejarse en los hallazgos MRI. Desafortunadamente, nuestros animales con altas dosis vectorianas más GCV sucumbieron antes de que pudiera llevarse a cabo el seguimiento de los MRI. Los animales con el vector a dosis altas sin GCV mostraron áreas de alta intensidad de la señal en las imágenes T2 a las tres semanas, que corresponden a las cavidades císticas que se apreciaron a las tres y seis semanas en la necropsia. A las tres semanas, era demostrable mediante MRI algún efecto mínimo de masa. El MRI de los animales restantes en este grupo, a las seis semanas, mostró una mejor delineación de la cavidad cística que correspondía a los hallazgos patológicos macroscópicos de una cavidad circunscrita resuelta. La fuga de gadolinio se apreció en estos animales, correspondiendo a los cambios inflamatorios alrededor de los vasos sanguíneos. Los animales con el vector a dosis moderadas más GCV, mostraron alteraciones del MRI mucho menos admirables, no apreciándose la formación de cavidades mediante el procesamiento de las imágenes o mediante la inspección macroscópica, cuya falta de formación de imágenes correspondía al efecto tóxico más bajo del régimen de tratamiento. Estos resultados indican que el MRI puede utilizarse para controlar los efectos tisulares de esta terapia.

Análisis PCR de tejidos de babuínos a los que se inyectaron dosis altas y moderadas de ADV/RSV-tk. Se utilizó tejido necrópsico (de un diámetro de 2 a 3 mm) para el análisis. En casos de muestras de órganos más grandes (cerebro, hígado, etc), se recogieron y agruparon múltiples muestras tisulares (de 4 a 6). El ADN total se aisló utilizando SDS y proteinasa K (Ausubel *et al*., 1987). Una parte alícuota de 1 μl de ADN de cada muestra se utilizó en la reacción PCR. Los oligonucleótidos de iniciación utilizados fueron un iniciador con sentido Adv3205 (5'-GTGTTACTCA TAGCGTAA-3') y un iniciador antisentido RSV 270A (5'-GACTCCTAACCGCGACA-3'), el primero situado en las secuencias adenovíricas y el otro en las RSV-LTR, emplazándose los dos 5' del gen de la timidina quinasa en el plásmido recombinante pADL-1/RSV-tk, utilizado para generar el virus recombinante. La reacción PCR se llevó a cabo durante 30 ciclos de 30s a 92ºC, de 30s a 50ºC, y de 1 m a 72ºC. La mezcla reactiva consistía en 50 μM de cada dNTP nd, de 50 pM de cada uno de los iniciadores y de 4 unidades de Taq polimerasa en un volumen total de 100 μl (Saiki, 1990). Al final de la PCR, una parte alícuota de 10 μl del producto, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa NuSieve al 4%. El gel se sometió a tinción con bromuro de etidio y se visualizó bajo luz ultravioleta. Las muestras que dieron lugar a un fragmento de 232 pares de bases, tal como se aprecia en el gel, se clasificaron como positivas. El sitio de inyección fue positivo en 3 de los 4 animales que recibieron altas dosis del virus. Un animal que tenía la secuencia vírica en el sitio de la inyección, mostraba también el virus en la médula espinal. Los otros dos animales que dieron positivo en el sitio de la inyección, fueron negativos en otras áreas del SNC (sistema nervioso central). Ningún otro tejido, incluyendo las gónadas, resultó positivo para las secuencias ADV/RSV-tk. Los resultados del análisis se dan en la Tabla III.

TABLA III

Análisis PCR de tejidos de babuínos inyectados con AVD/RSV-tk ND= no realizado

ORGANO	Dosis mod + GCV; ♂	Dosis mod + GCV; ♂	D. alta + GCV; ♂	D. alta + GCV; ♂	D. alta -GCV; ♂	D. alta -GCV; ♂
Sitio de inyección	-	-	+	+	+	-
CNS distal al sitio	-	-	+	-	-	-
Pulmón	ND	-	ND	-	-	-
Riñón	-	-	-	-	-	ND
Ovario/gónadas	*	-	-	-	-	-

* Eliminado antes del estudio.

La totalidad de las patentes y publicaciones que se mencionan en la presente solicitud, indican los niveles de los expertos en la materia, a la que la invención pertenece.

Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetivos y conseguir las finalidades y ventajas que se mencionan, así como las inherentes a ella. Los métodos, procedimientos, tratamientos, moléculas y compuestos específicos que se describen en la presente memoria, representan actualmente las formas de realización preferidas, son ejemplificativos y no limitativos del alcance de la invención. Para los expertos en la materia resultarán evidentes modificaciones en la presente memoria y se presentarán usos que están incluidos en las enseñanzas de la invención y están definidos por el alcance dentro de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Sistema de suministro de ADN para administrar un gen suicida y uno o más genes de la citoquina contenidos en el ADN para un individuo, para el tratamiento de un tumor sólido, papiloma o verruga, en un animal no humano o en un humano, seleccionándose dicho sistema de suministro de ADN de entre un vector vírico, un vector episómico, un liposoma, un lípido catiónico o un sistema de suministro no viral constituido por el ADN o ARN de interés, una porción que reconoce y se une a un receptor superficial celular o antígeno, una porción de unión al ADN, y una porción lítica que permite el transporte de un complejo desde la superficie celular al citoplasma, en el que el gen suicida y dichos uno o más genes de la citoquina están contenidos en el interior de dichos ADN o ARN y pueden ser expresados, y en el que el gen suicida está adaptado para codificar una proteína que puede convertir enzimáticamente *in vivo* un profármaco que se administra a dicho animal o humano en un compuesto tóxico.

2. Sistema según la reivindicación 1, en el que la secuencia del gen suicida está adaptada para expresar los códigos para una proteína seleccionada de entre la timidina quinasa del virus del herpes simplex, una timidinaquinasa del virus de la varicela zoster o una citosina desaminasa bacteriana.

3. Sistema según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha una o más secuencias del gen de la citoquina, son seleccionadas de entre interleucina-1, interleucina-2, interleucina-4, interleucina-6, interleucina-7, interleucina-10, interleucina-12, interferón-α, interferón-β, interferón-δ, factor de necrosis tumoral α y el factor de necrosis tumoral β, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) o factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF).

4. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia del gen suicida está adaptada para expresar una proteína que puede convertir un profármaco seleccionado de entre ganciclovir, aciclovir, 1-5 yodouracilo FIAU, 5-fluorocitosina, o 6-metoxipurina arabinósido o un derivado de los mismos.

5. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, cuando se adapta para tratar un tumor seleccionado de entre un cáncer de colon, prostático, mamario, pulmonar, dérmico, hepático, óseo, pancreático, ovárico, testicular, de la vejiga, renal, cerebral, de cabeza o de cuello.

6. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, cuando se adapta para tratar un papiloma seleccionado de entre un papiloma de células escamosas, un papiloma del plexo coroideo o un papiloma laríngeo.

7. Sistema según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, cuando se adapta para tratar una verruga seleccionada de entre una verruga genital, una verruga plantar, una epidermodisplasia verruciforme o una verruga maligna.

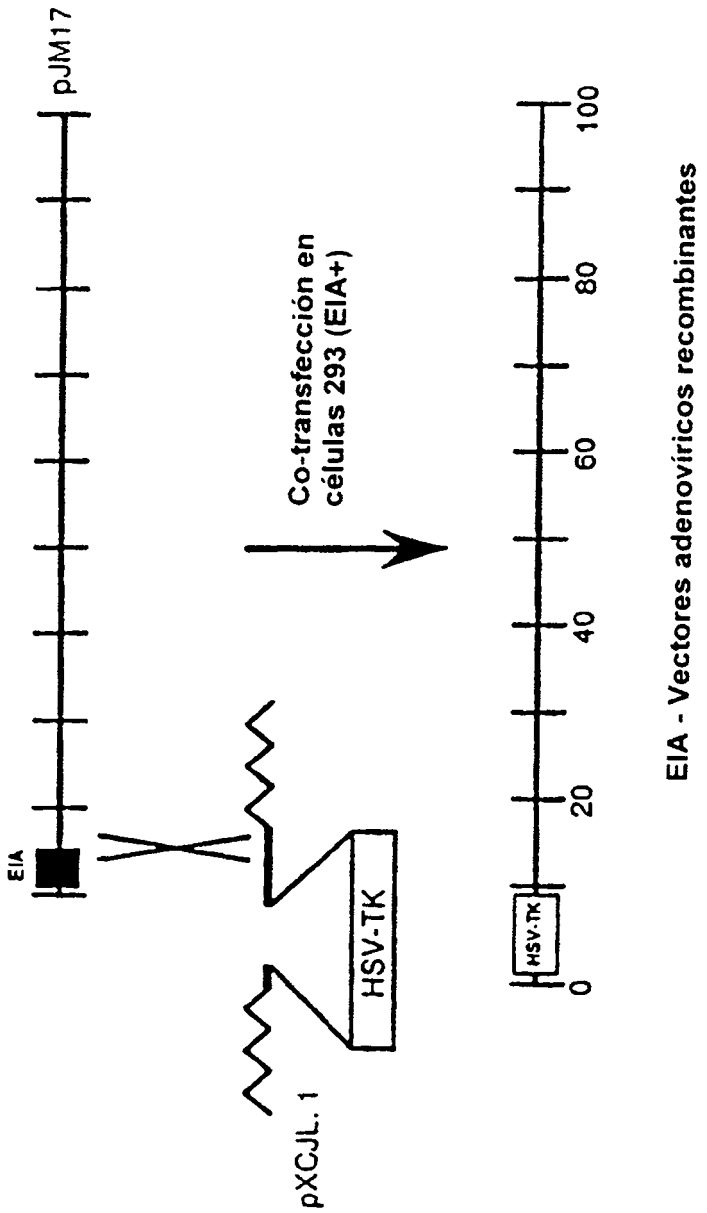

pJM17
EIA
Co-transfección en células 293 (EIA+)
HSV-TK
pXCJL. 1
HSV-TK
0
20
40
60
80
100
EIA - Vectores adenovíricos recombinantes

Figura 1

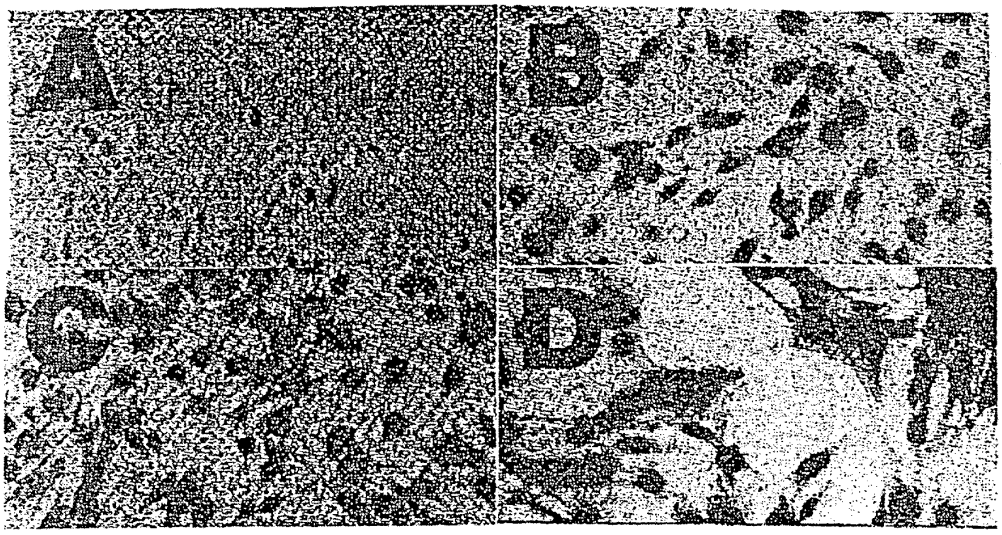


Figura 2A-C

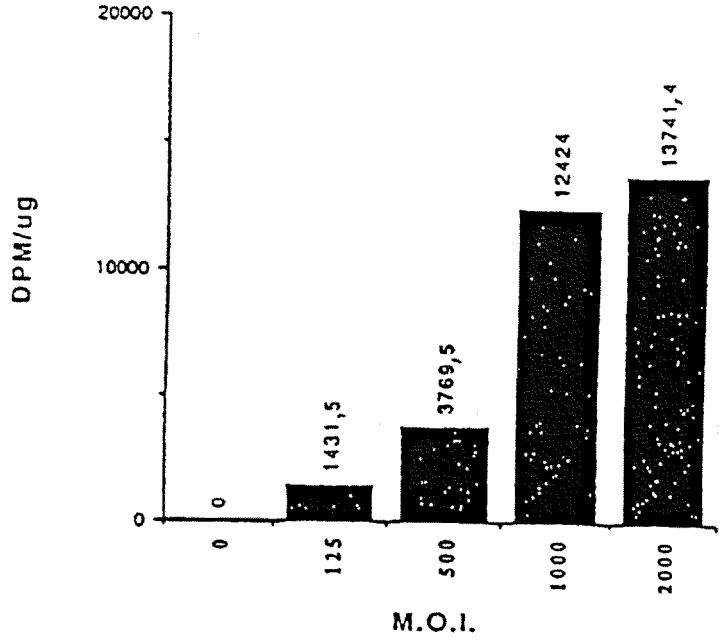

20000
10000
0
DPM/ug
0
1431,5
3769,5
12424
13741,4
0
125
500
1000
2000
M.O.I.

Figura 3

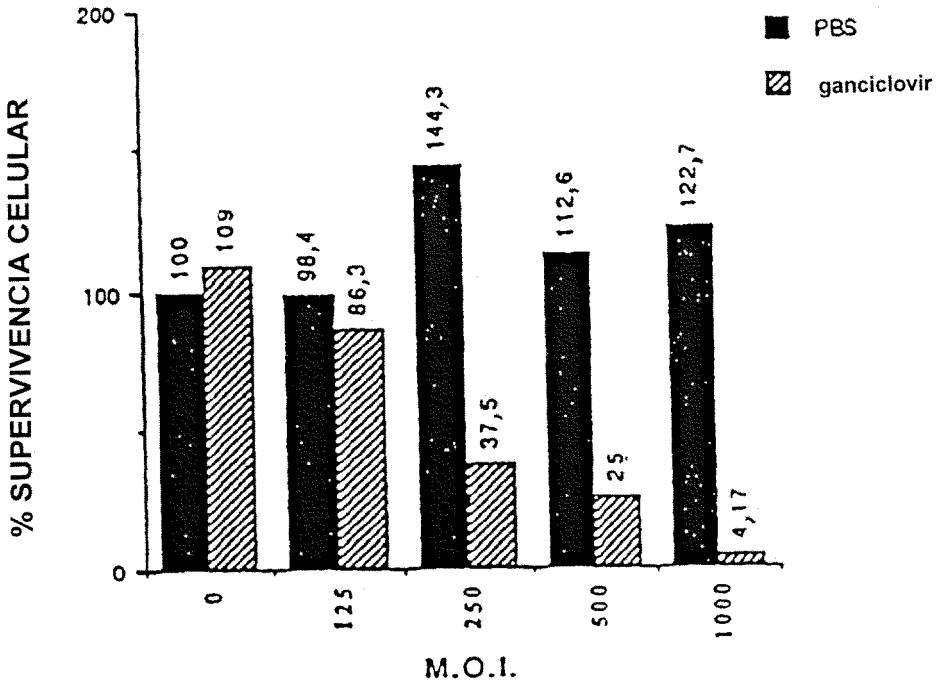

200
100
0
% SUPERVIVENCIA CELULAR
PBS
ganciclovir
100
109
98,4
86,3
144,3
37,5
112,6
25
122,7
4,17
0
125
250
500
1000
M.O.I.

Figura 4

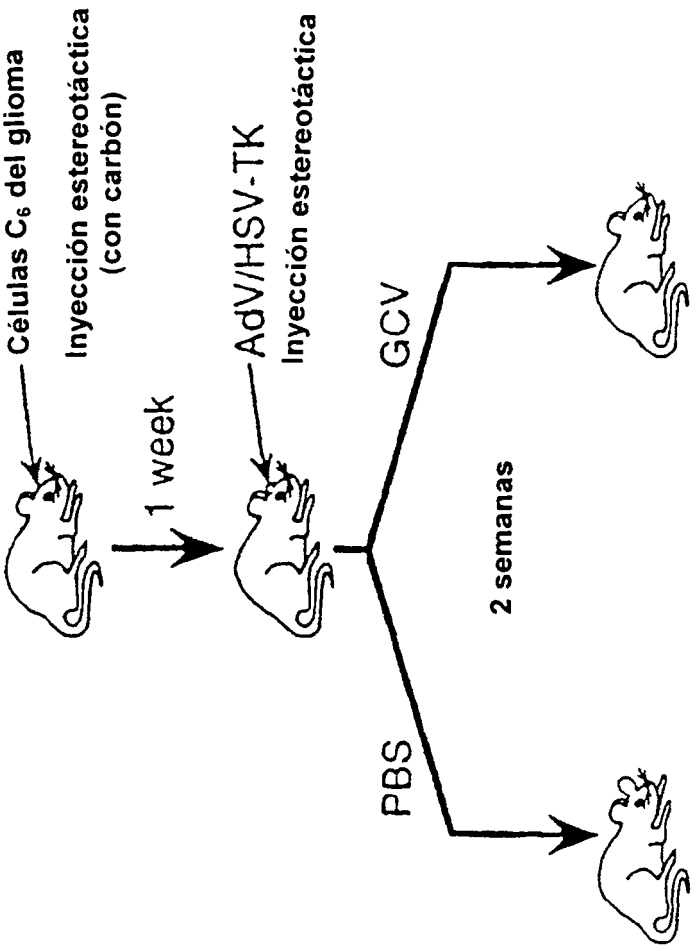

Células C_6 del glioma
Inyección estereotáctica
(con carbón)
1 week
AdV/HSV-TK
Inyección estereotáctica
GCV
PBS
2 semanas

Figura 5

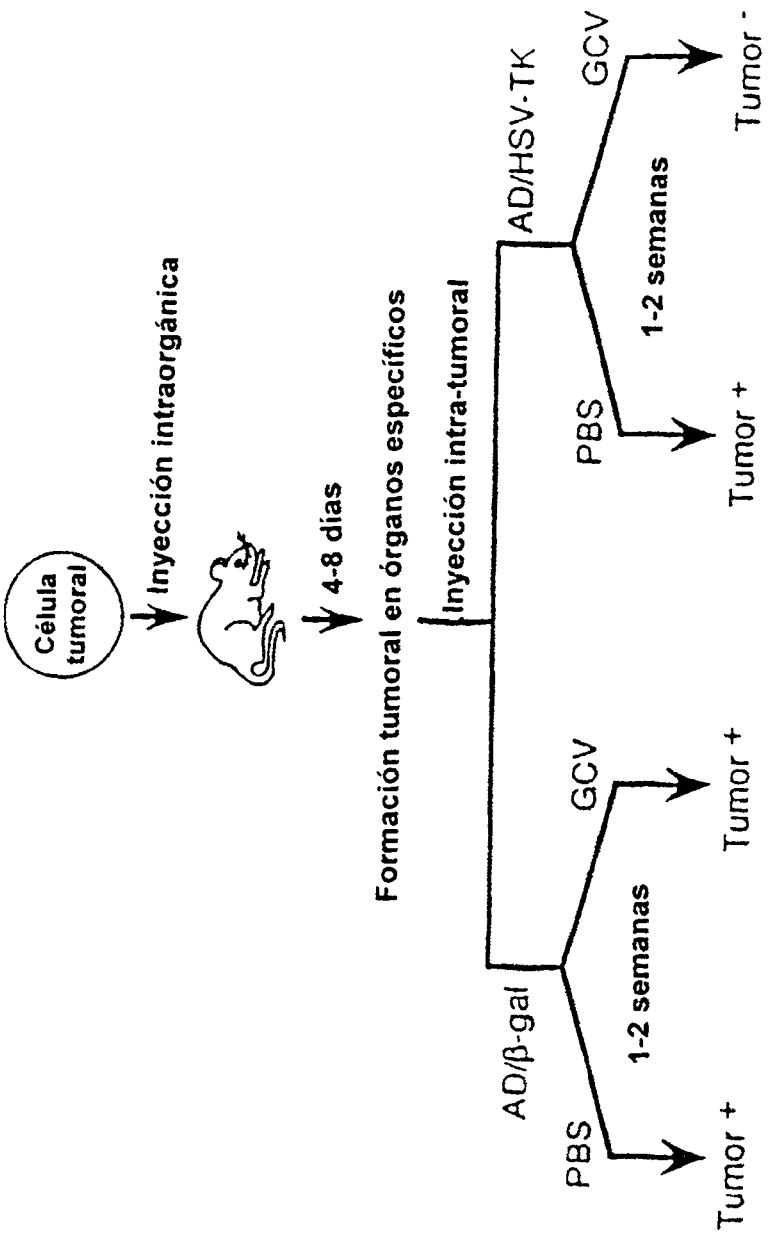

Célula tumoral
Inyección intraorgánica
4-8 dias
Formación tumoral en órganos específicos
Inyección intra-tumoral
AD/β-gal
PBS
GCV
1-2 semanas
Tumor +
Tumor +
AD/HSV-TK
PBS
GCV
1-2 semanas
Tumor +
Tumor -

Figura 6

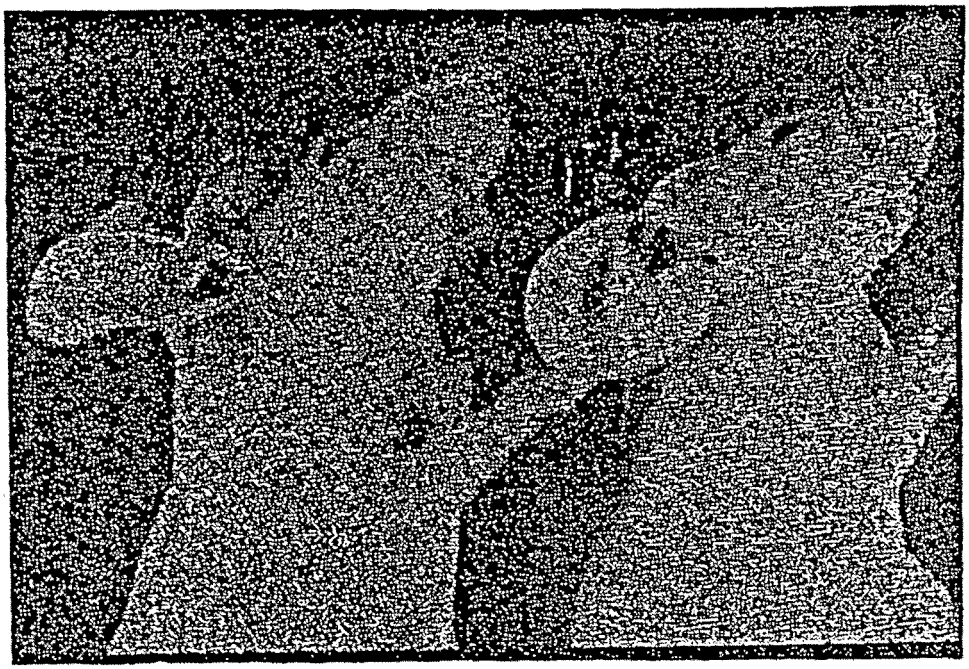


Figura 7

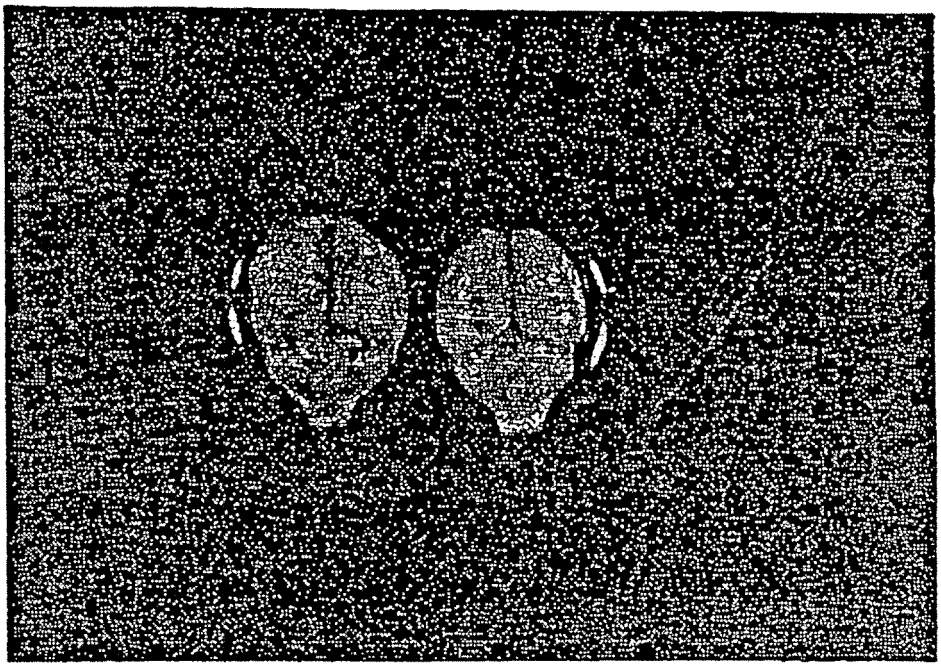


Figura 8

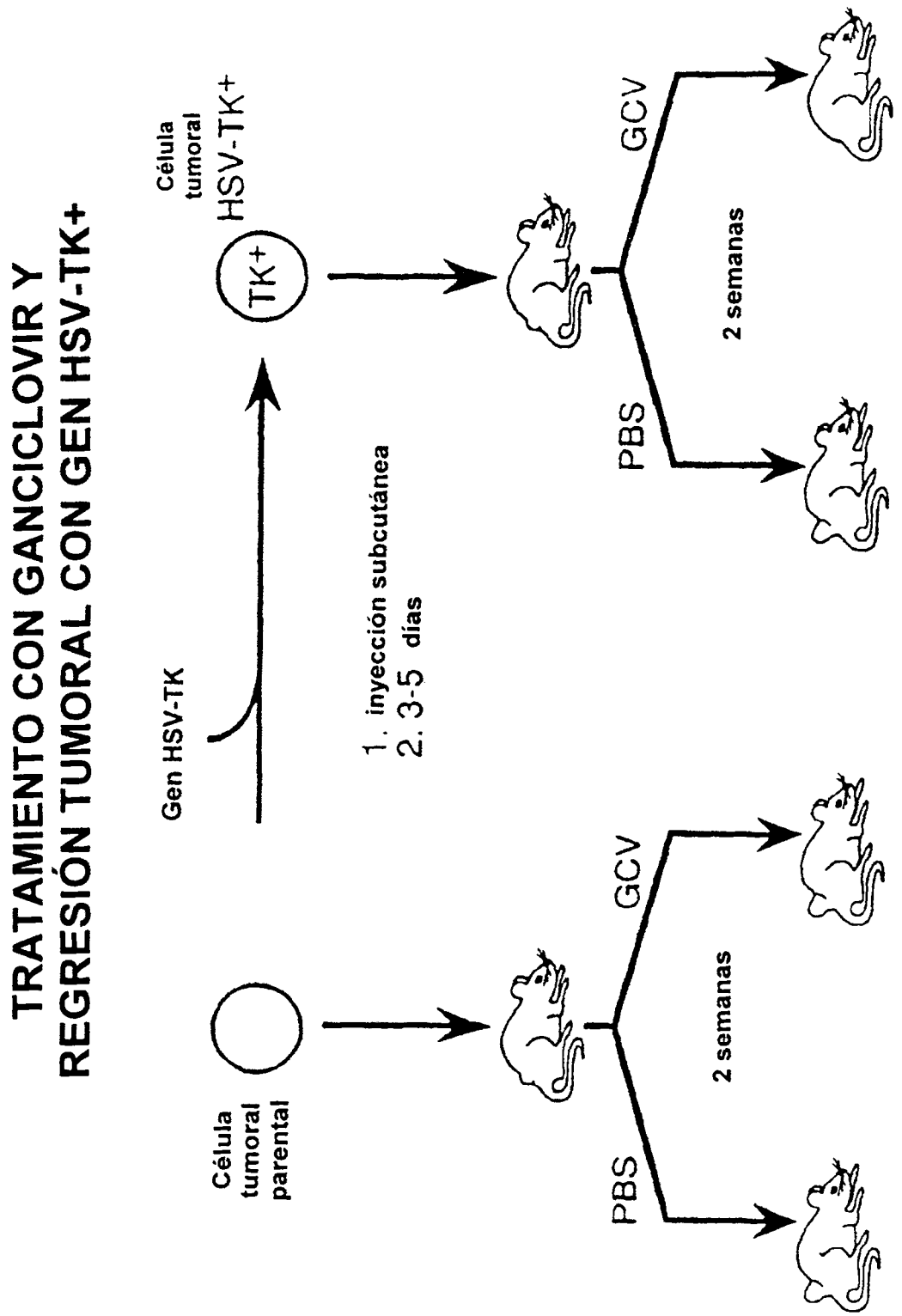
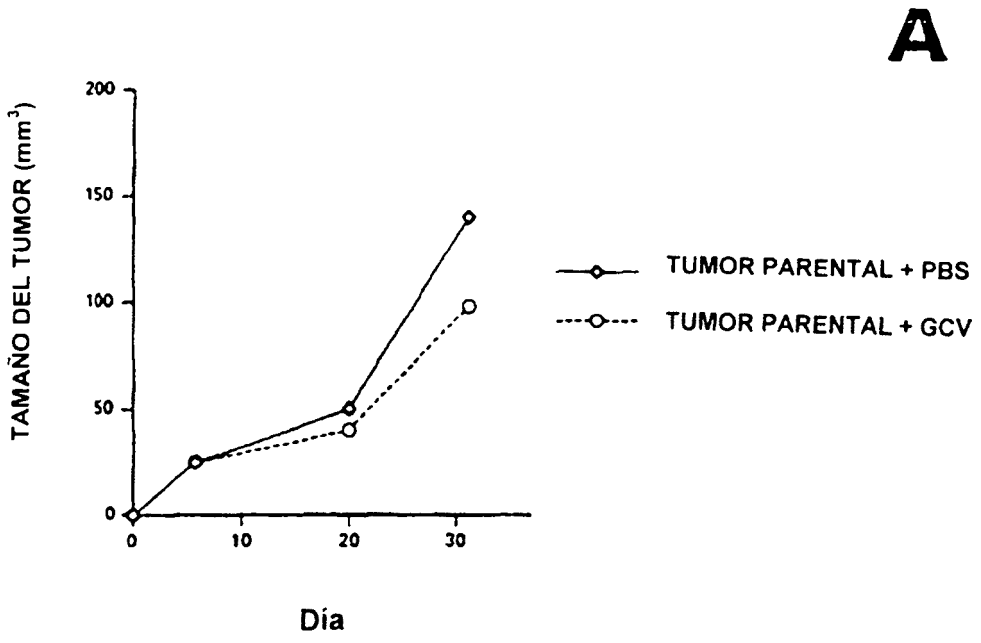

TRATAMIENTO CON GANCICLOVIR Y
REGRESIÓN TUMORAL CON GEN HSV-TK+
Célula tumoral parental
Gen HSV-TK
Célula tumoral HSV-TK+
TK+
1. inyección subcutánea
2. 3-5 días
PBS
GCV
2 semanas
PBS
GCV
2 semanas

Figura 9


A
TAMAÑO DEL TUMOR (mm3)
200
150
100
50
0
0
10
20
30
Día
TUMOR PARENTAL + PBS
TUMOR PARENTAL + GCV

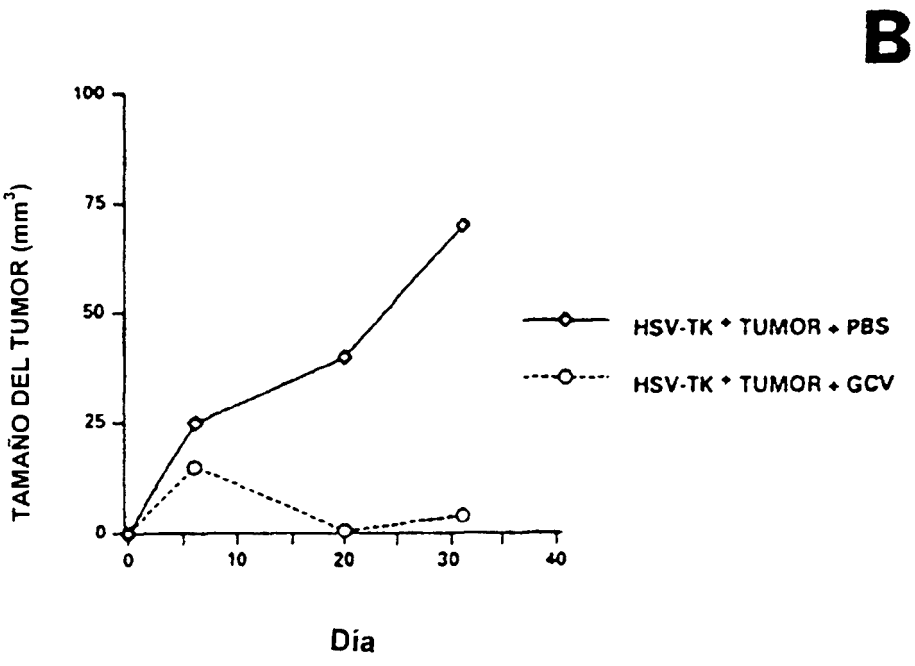

B
TAMAÑO DEL TUMOR (mm3)
100
75
50
25
0
0
10
20
30
40
Día
HSV-TK + TUMOR + PBS
HSV-TK + TUMOR + GCV

Figura 10 A - B

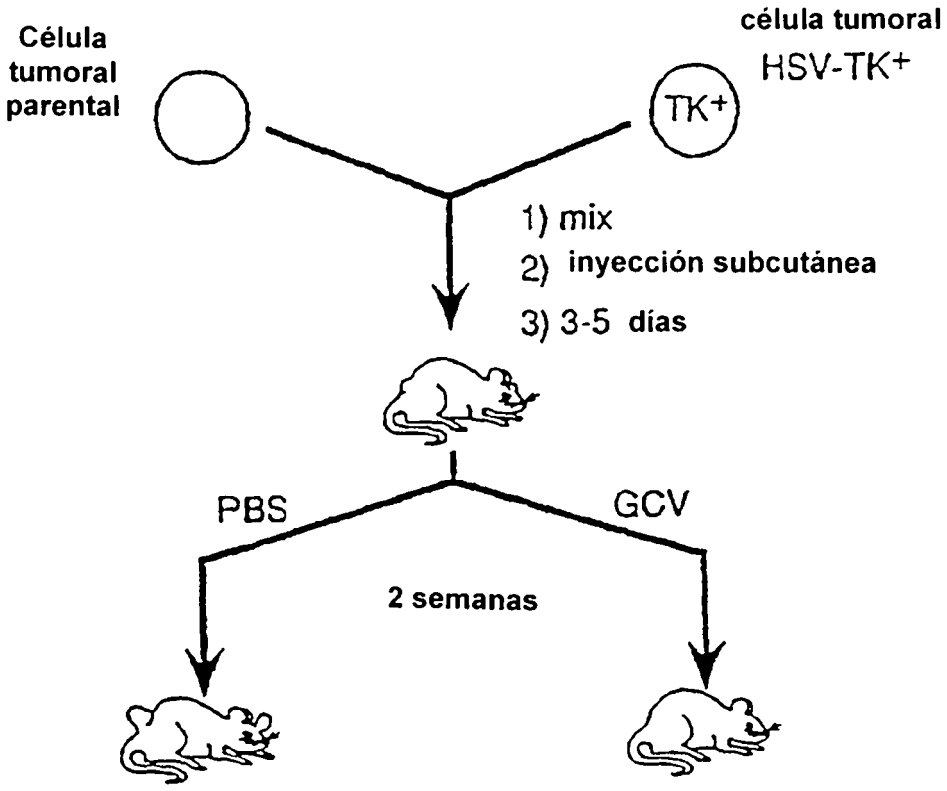

Célula tumoral parental
célula tumoral HSV-TK+
TK+
1) mix
2) inyección subcutánea
3) 3-5 días
PBS
GCV
2 semanas

Figura 11

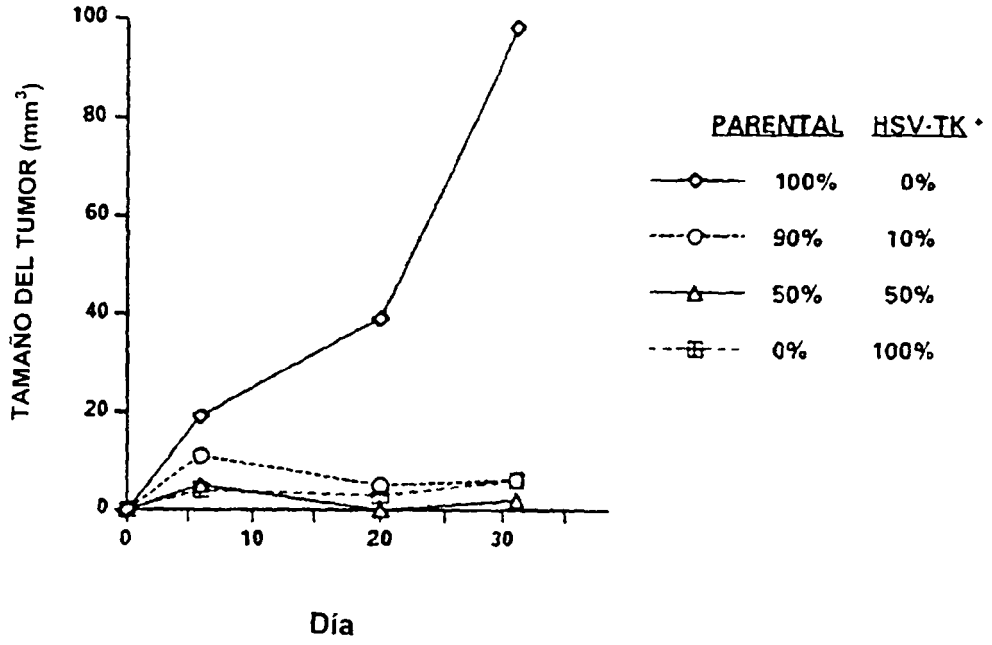

TAMAÑO DEL TUMOR (mm3)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
Día
PARENTAL
HSV-TK +
100%
0%
90%
10%
50%
50%
0%
100%

Figura 12

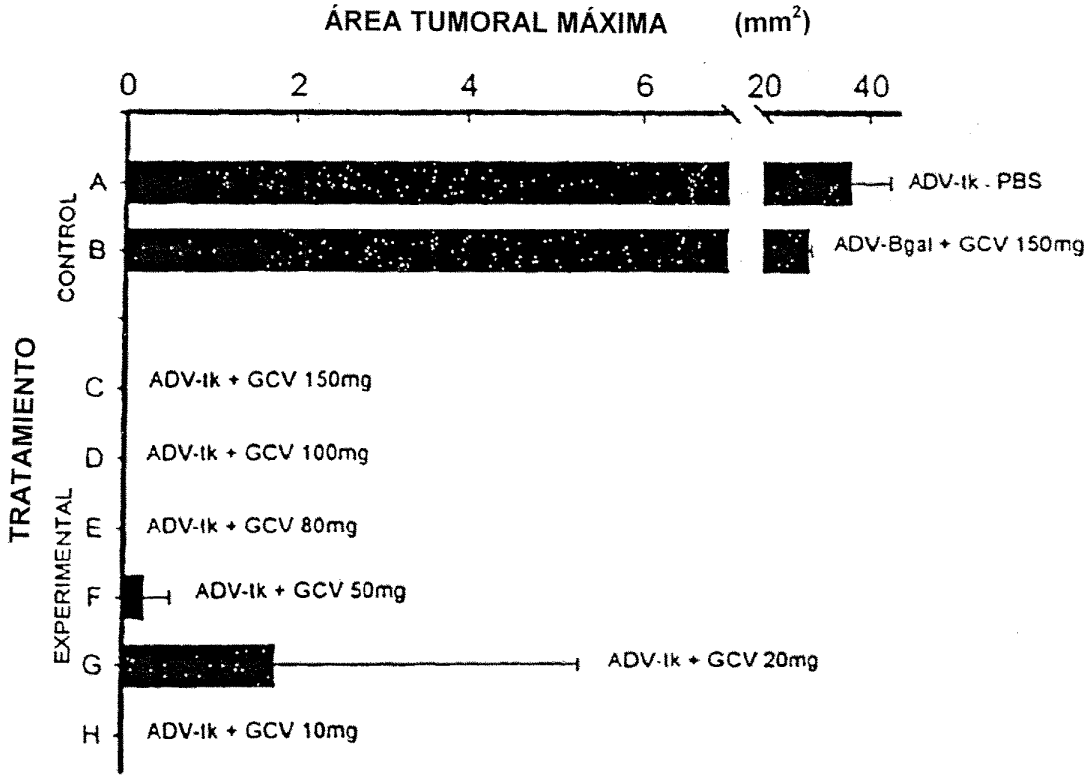

ÁREA TUMORAL MÁXIMA (mm²)
0
2
4
6
20
40
TRATAMIENTO
CONTROL
EXPERIMENTAL
A
B
C
D
E
F
G
H
ADV-tk - PBS
ADV-Bgal + GCV 150mg
ADV-tk + GCV 150mg
ADV-tk + GCV 100mg
ADV-tk + GCV 80mg
ADV-tk + GCV 50mg
ADV-tk + GCV 20mg
ADV-tk + GCV 10mg

Figura 13

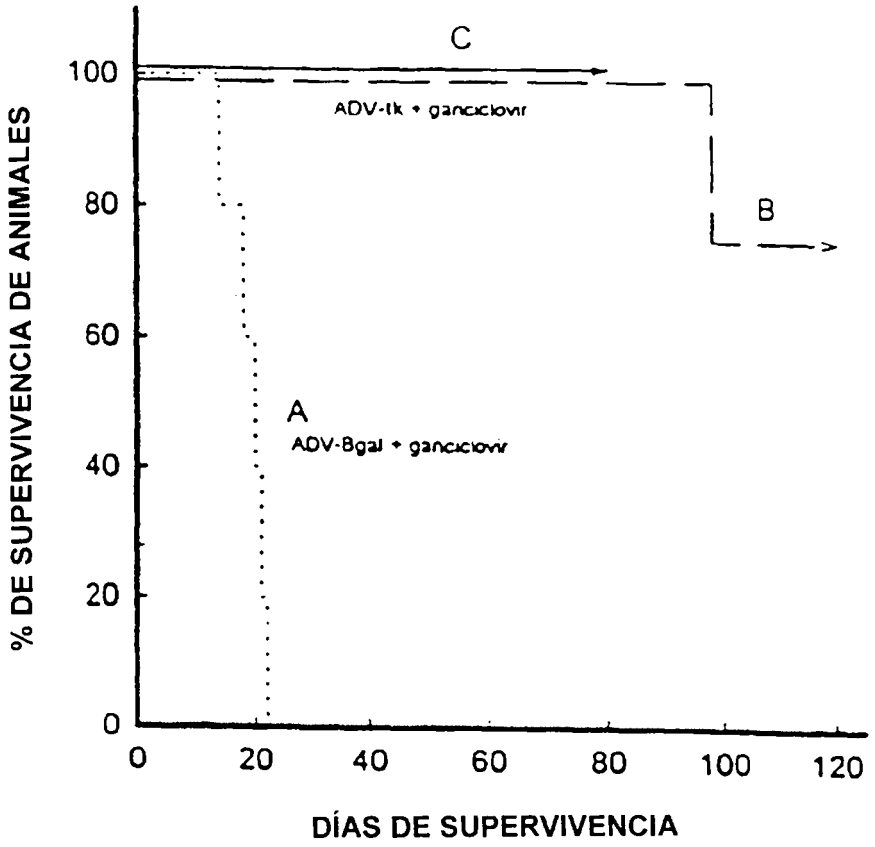

C
100
ADV-tk + ganciclovir
80
B
60
A
ADV-Bgal + ganciclovir
40
20
0
% DE SUPERVIVENCIA DE ANIMALES
0
20
40
60
80
100
120
DÍAS DE SUPERVIVENCIA

Figura 14

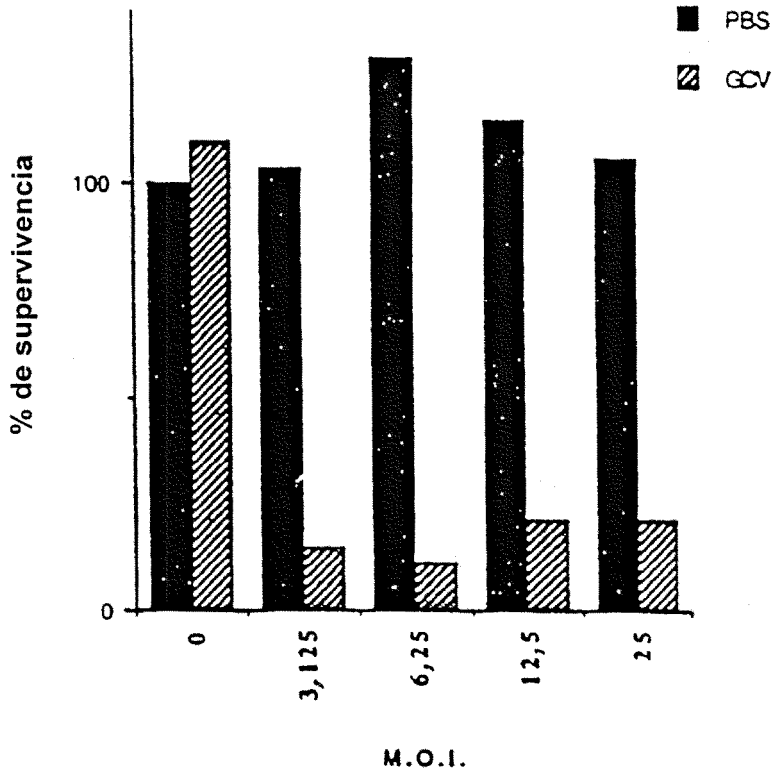


Figura 15

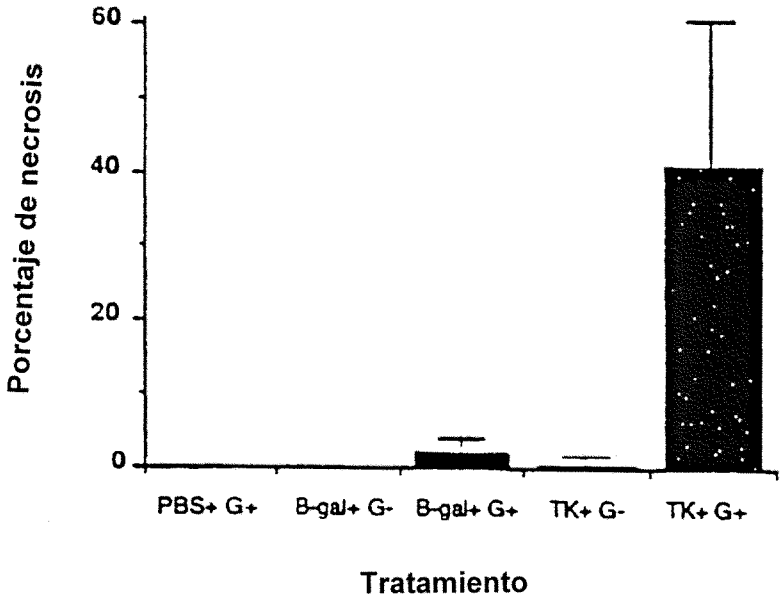

60
40
20
0
Porcentaje de necrosis
PBS+ G+
B-gal+ G-
B-gal+ G+
TK+ G-
TK+ G+
Tratamiento

Figura 16

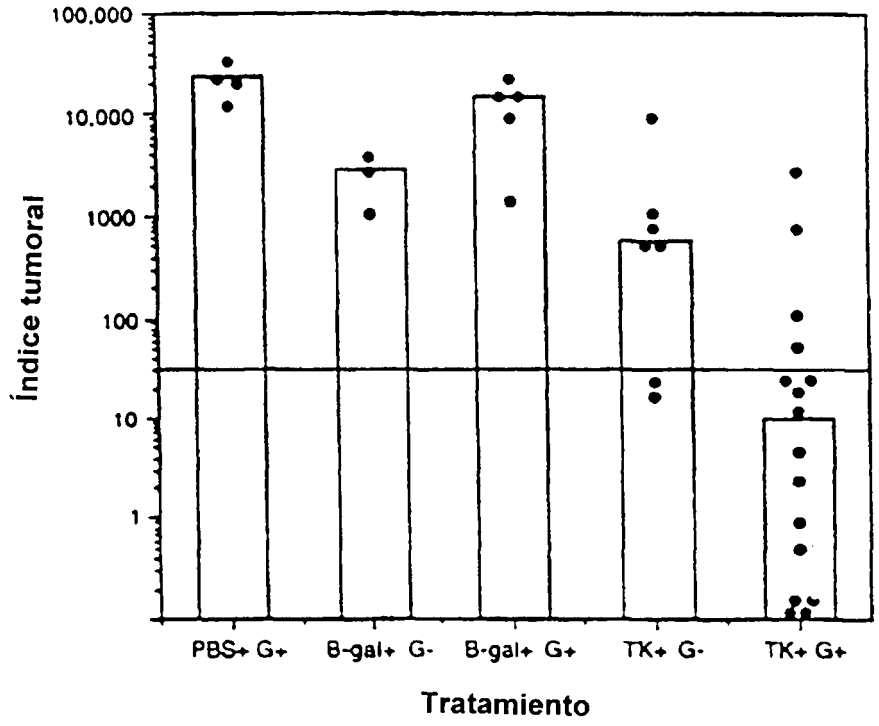

100.000
10.000
1000
100
10
1
Índice tumoral
PBS+ G+
B-gal+ G-
B-gal+ G+
TK+ G-
TK+ G+
Tratamiento

Figura 17

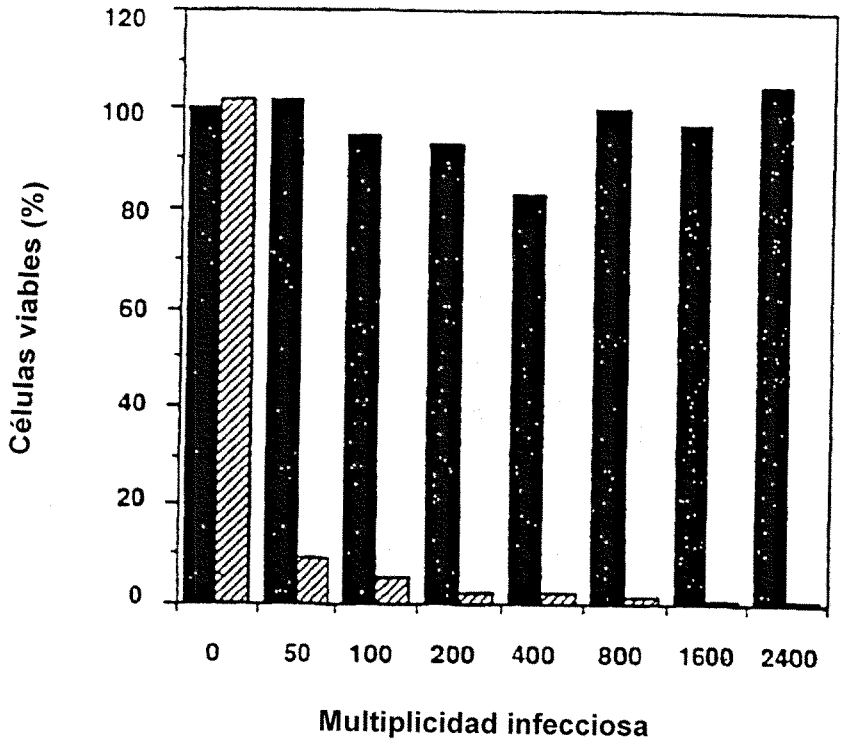

120
100
80
60
40
20
0
Células viables (%)
0
50
100
200
400
800
1600
2400
Multiplicidad infecciosa

Figura 18

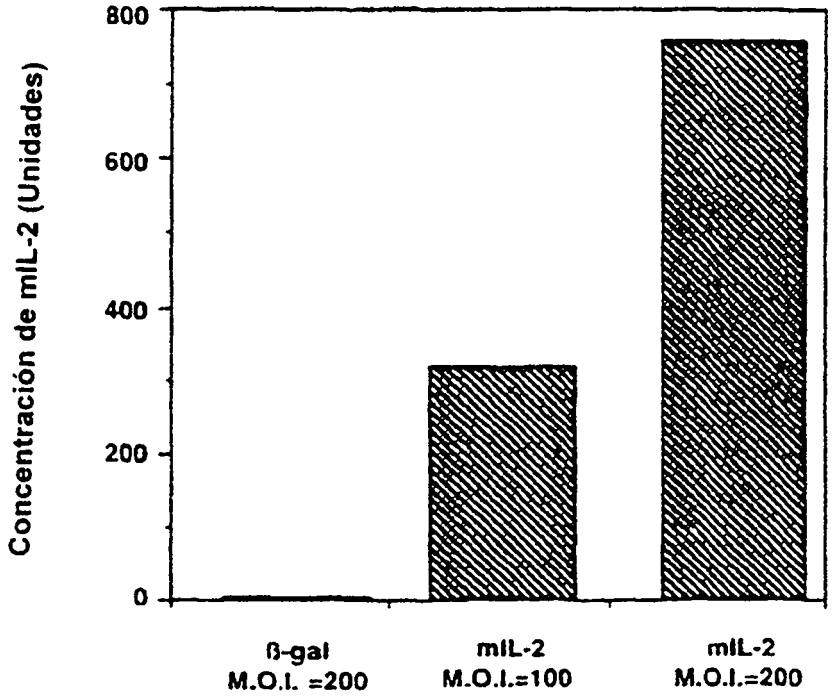

Concentración de mIL-2 (Unidades)
800
600
400
200
0
ß-gal
M.O.I. =200
mIL-2
M.O.I.=100
mIL-2
M.O.I.=200

Figura 19

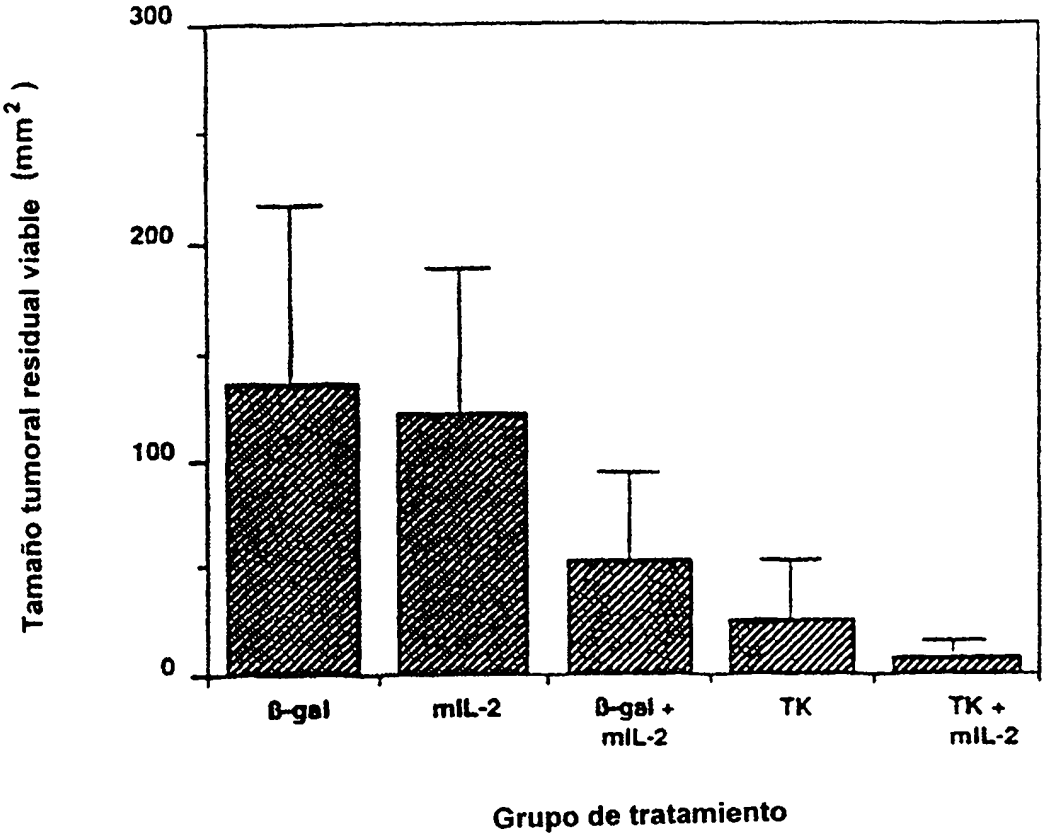

300
200
100
0
Tamaño tumoral residual viable (mm2)
ß-gal
mIL-2
ß-gal + mIL-2
TK
TK + mIL-2
Grupo de tratamiento

Figura 20

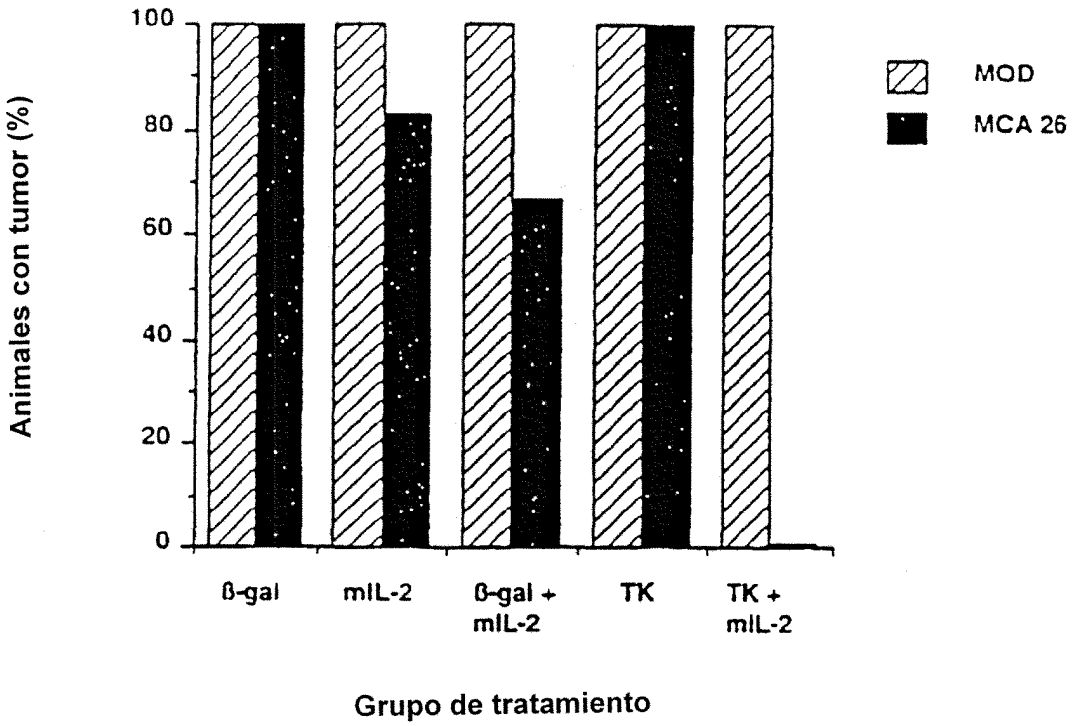

Animales con tumor (%)
100
80
60
40
20
0
ß-gal
mIL-2
ß-gal + mIL-2
TK
TK + mIL-2
MOD
MCA 26
Grupo de tratamiento

Figura 21

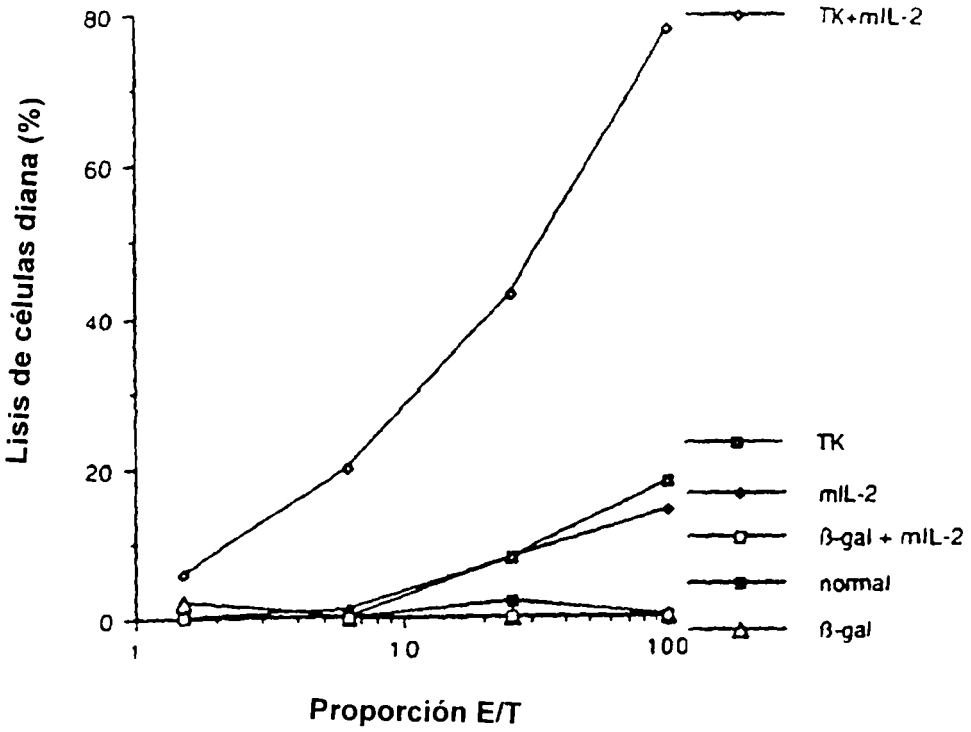

Lisis de células diana (%)
80
60
40
20
0
1
10
100
Proporción E/T
TK+mIL-2
TK
mIL-2
ß-gal + mIL-2
normal
ß-gal

Figura 22

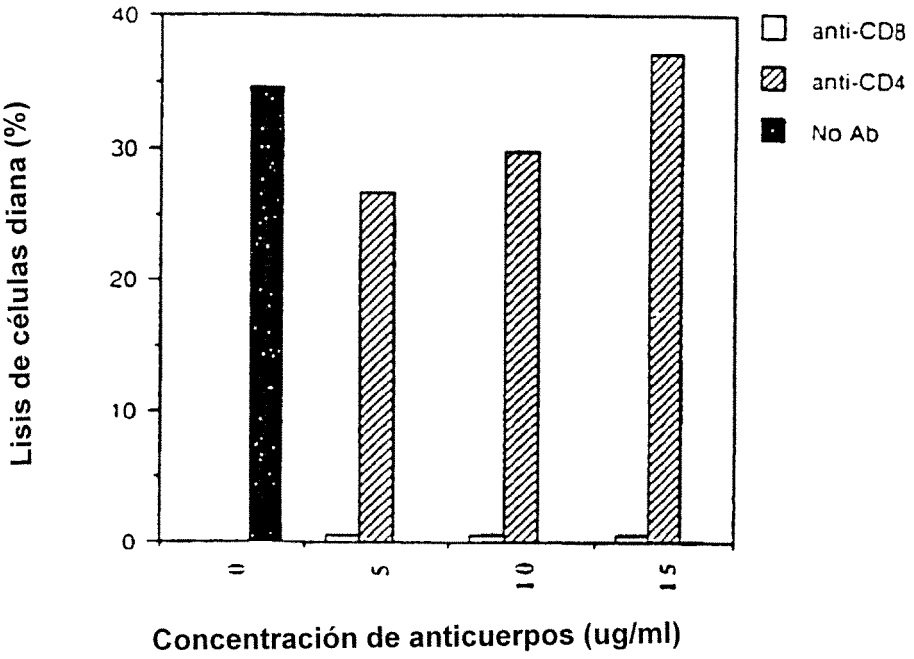

40
30
20
10
0
Lisis de células diana (%)
0
5
10
15
Concentración de anticuerpos (ug/ml)
anti-CD8
anti-CD4
No Ab

Figura 23