



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 277 356**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97920192 .8**
86 Fecha de presentación : **07.04.1997**
87 Número de publicación de la solicitud: **0927043**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.07.1999**

54 Título: **Método para transferir genes al sistema nervioso central.**

30 Prioridad: **08.04.1996 US 629308**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2007

73 Titular/es: **New York University**
550 First Avenue
New York, New York 10016, US
TITAN PHARMACEUTICALS, Inc.

72 Inventor/es: **Cherskey, Bruce y**
Bucalo, Louis, R.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 277 356 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para transferir genes al sistema nervioso central.

1. Introducción

La presente invención se refiere a un medio para implantar células productoras en el cerebro de un mamífero. Las células productoras están modificadas genéticamente con un vector recombinante basado en retrovirus que codifica un factor tumoricida o factor de susceptibilidad que confiere a las células tumorales sensibilidad a agentes quimioterapéuticos o radioterapéuticos. Antes del trasplante en el cerebro del mamífero, las células productoras se cultivan primero *in vitro* en una matriz de soporte para aumentar la viabilidad a largo plazo de las células transplantadas y para proporcionar un beneficio funcional a largo plazo.

2. Antecedentes de la invención

Los tumores cerebrales son la causa principal de muertes por cáncer en las personas menores de 35 años. La incidencia de tumores del sistema nervioso central es de más de dos veces la de la enfermedad de Hodgkin, más de la mitad de la de melanoma y, en mujeres, la frecuencia de mortalidad causada por tumores del sistema nervioso central es casi equivalente a la causada por cáncer de ovario. En niños, los tumores cerebrales son el tumor sólido más común y están en segundo lugar solamente detrás de la leucemia como causa global del cáncer en los niños. (Dale, D.C. y Federman, D.D., 1995, Scientific American Medicine, Scientific American, Inc., Nueva York, Capítulo 7.) La mayoría de los tumores cerebrales son inoperables; e incluso para los tumores cerebrales que son operables, la cirugía es extremadamente difícil y frecuentemente conduce a trastornos neurológicos.

La aplicación *in vivo* de terapia génica mediada por vectores retrovirales se ha aplicado al tratamiento de tumores cerebrales (Oldfield *et al.*, 1993, Hum. Gene Ther.; 4:39-69; Culver *et al.*, 1992 Science 256:1550-2). Quizás, la aplicación más ampliamente estudiada de la terapia génica utiliza retrovirus modificados genéticamente para expresar proteínas que activan un profármaco relativamente no tóxico para formar un agente altamente tóxico. Por ejemplo, las células productoras retrovirales que expresan factores de susceptibilidad se han transplantado en el tejido cerebral de pacientes para eliminar las células tumorales (Barba, D. *et al.*, documento WO 93/04167). Una aplicación particular del sistema utiliza el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple que confiere sensibilidad a fármacos anti-virales tales como ganciclovir y aciclovir (Barba *et al.*, documento WO 93/04167; Moolten, F.L. *et al.*, 1986, Cancer Research 46:5276-5281). El producto del gen HSV-TK cataliza la fosforilación de varios análogos de nucleósidos que son malos sustratos para la TK de células de mamífero. Por ejemplo, el fármaco anti-herpes aciclovir muestra toxicidad mínima para células que carecen de actividad HSV-TK, pero se activa en células que expresan HSV-TK en una forma tóxica capaz de inhibir la síntesis de ADN y que ha demostrado presentar citotoxicidad selectiva para células que expresan el gen HSV-TK.

Una preocupación asociada con el uso de terapia génica mediada por vectores retrovirales es que las células productoras implantadas no podrían continuar sobreviviendo y/o expresando los genes terapéuticos

durante los periodos de tiempo necesarios para conseguir el beneficio terapéutico máximo. Generalmente se sabe que las células implantadas directamente en el cerebro mueren en aproximadamente un periodo de dos a cuatro semanas (véase, por ejemplo, Itukura, T. *et al.*, 1988, J. Neurosurg. 68:955-959). En algunos casos, la adherencia de las células a microvehículos, antes del implante *in vivo*, ha demostrado potenciar la viabilidad a largo plazo de células transplantadas (Cherskey *et al.*; documento WO 9206702) pero hasta la fecha este método no se ha aplicado satisfactoriamente a líneas celulares productoras retrovirales.

3. Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un medio para transferir genes que codifican un factor tumoricida o factor de susceptibilidad a células tumorales cerebrales. El medio comprende el implante de células productoras modificadas genéticamente con un vector recombinante basado en retrovirus que codifica un factor tumoricida o factor de susceptibilidad en el cerebro del mamífero. Las células productoras modificadas genéticamente producen partículas retrovirales infecciosas que son capaces de infectar las células tumorales cerebrales adyacentes volviendo de este modo a las células tumorales sensibles a agentes quimioterapéuticos o radioterapéuticos. Como el sistema de transferencia de genes en vector retroviral requiere una célula diana proliferante para la integración y expresión génica en el cerebro, la aplicación de este sistema a tumores cerebrales tiene la ventaja de que los retrovirus están dirigidos a las células proliferantes del tumor cerebral, mientras que las células cerebrales no proliferantes normales permanecen sin infectar.

Pueden usarse varios genes que codifican factores tumorocidas o de susceptibilidad en la práctica de la invención. Dichos genes codifican enzimas que pueden convertir un profármaco relativamente no tóxico en un agente altamente tóxico. Las células modificadas genéticamente para que expresen dichos genes esencialmente cometen suicidio metabólico en presencia del profármaco apropiado.

En una realización de la invención, el gen de la timidina quinasa del herpes simple (HSV-TK) puede modificarse genéticamente en los vectores retrovirales recombinantes. Cualquier célula posteriormente infectada con los retrovirus recombinantes, y que exprese el gen HSV-TK, llegaría a ser sensible a agentes quimioterapéuticos tales como aciclovir y ganciclovir. En otra realización de la invención, puede modificarse genéticamente el gen de la citosina desaminasa (CD) en vectores retrovirales recombinantes. Las células que expresan el gen CD metabolizan el profármaco relativamente no tóxico 5-fluorocitosina en el 5-fluorouracilo altamente tóxico (Mullen, CA *et al.*, 1994, Cancer Res. 54:1503-6).

La presente invención comprende adicionalmente el cultivo de las células productoras *in vitro* en una matriz de soporte antes del implante en el cerebro del mamífero. La preadhesión de las células a microvehículos antes del implante en el cerebro está diseñada para potenciar la viabilidad a largo plazo de las células transplantadas y proporcionar un beneficio funcional a largo plazo.

La invención se basa, en parte, en la demostración de que la preadhesión de células productoras a microvehículos antes del trasplante en el cerebro de un mamífero potencia la viabilidad de las células trans-

plantadas. En una realización particular, descrita en este documento, las células productoras se transplantaron en los cerebros de ratas. Las células productoras transplantadas producen partículas retrovirales infecciosas que se han modificado genéticamente para expresar el gen de la fosfatasa alcalina. Los resultados demuestran la expresión exitosa a largo plazo del gen de la fosfatasa alcalina en el cerebro del animal transplantado.

4. Descripción de los dibujos

Figura 1. Sección de los cerebros de ratas a las que se les ha implantado células no transfectadas sobre perlas de microvehículo (aumento 20x). Se observa poca o ninguna tinción rodeando las perlas.

Figura 2. Sección de los cerebros de ratas a las que se les ha implantado células transfectadas, sin microvehículos (aumento 20x). No se observa tinción en la sección.

Figura 3. Sección de los cerebros de ratas a las que se les ha implantado 30 días antes células transfectadas con el plásmido del gen de la fosfatasa alcalina en perlas de microvehículo (aumento 10x). Se observa elevada densidad de material teñido de oscuro (células).

5. Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para tratar tumores cerebrales que comprende el implante, en el cerebro de un mamífero, de células productoras modificadas genéticamente con un vector recombinante basado en retrovirus que codifica un factor tumoricida o factor de susceptibilidad. Las células productoras producen partículas retrovirales infecciosas que son capaces de infectar células tumorales cerebrales volviendo de este modo a esas células tumorales sensibles a agentes quimioterapéuticos. La viabilidad a largo plazo de las células productoras puede potenciarse a través del cultivo *in vitro* de las células productoras en una matriz de soporte antes del implante.

En particular, se ha demostrado que el ADN de interés puede introducirse de manera eficaz y estable en "células productoras" que se transfieren posteriormente a una matriz de soporte que puede transplantarse o injertarse en un cerebro de mamífero. Las células productoras producen partículas retrovirales infecciosas que pueden infectar el tejido cerebral localizado en cercana proximidad a las células productoras implantadas. El tejido cerebral infectado demostró expresar el gen de interés hasta 30 días después del trasplante.

5.1. Vectores retrovirales

Para expresar factores tumoricidas o de susceptibilidad, las secuencias nucleotídicas que codifican dichos factores se insertan en un vector de expresión retroviral apropiado. Pueden usarse métodos que son bien conocidos para los especialistas en la técnica para construir los vectores retrovirales recombinantes que contienen secuencias que codifican nucleótidos tumoricidas o de susceptibilidad asociadas de forma operativa a las señales de control de la transcripción/traducción apropiadas. La construcción de vectores retrovirales recombinantes que contienen las secuencias codificantes tumoricidas o de susceptibilidad pueden generarse usando técnicas de ligamiento y restricción convencionales que son bien entendidas en la técnica. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al.*, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 2a ed., 1989 y Auselbel *et al.*, 1989, Current Protocols

in Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, N.Y.

Los especialistas en la técnica pueden utilizar una diversidad de vectores recombinantes basados en retrovirus igual de bien. Los vectores recombinantes pueden contener cantidades variables de secuencias retrovirales que incluyen repeticiones terminales largas retrovirales (LTR), que son necesarias para la integración en el genoma hospedador, y señales de empaquetado (psi) que son necesarias para la encapsidación de transcritos de ARN recombinantes de los provirus en partículas virales maduras. Los vectores retrovirales particularmente adecuados incluyen, aunque sin limitación, los descritos en las siguientes referencias, que se incorporan cada una como referencia: vectores SAX (Kantoff P.W. *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6563); vectores N2 (D. Armentano *et al.*, 1987, J. Virology 61:1647); vectores LXS-NA (Miller A.D. *et al.*, 1989, Biotechniques 7:980-990); y vectores LASN (Blood 72:876-81).

Los vectores recombinantes también pueden contener secuencias plasmídicas bacterianas necesarias para conferir resistencia a antibióticos tales como ampicilina y tetraciclina y secuencias necesarias para la replicación en bacterias. Además, los vectores recombinantes pueden contener genes marcadores de selección que pueden usarse para identificar células transfectadas de forma estable. El marcador de selección en los vectores recombinantes confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el vector de expresión retroviral recombinante en sus cromosomas. Este método puede usarse de forma ventajosa para identificar líneas celulares productoras transfectadas satisfactoriamente que posteriormente producirán partículas retrovirales infecciosas.

Pueden usarse varios sistemas de selección, incluyendo, aunque sin limitación, los genes de la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026), y la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy, *et al.*, 1980, Cell 22:817) que pueden usarse en células HGPRT⁻ o APRT⁻, respectivamente. Además, puede usarse resistencia a antimetabolitos como base de selección para los genes DHFR, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, *et al.*, 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare, *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); GPT, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin, *et al.*, 1981, J. Mol. Biol. 150:1); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre, *et al.*, 1984, Gene 30:147). Recientemente, se han descrito genes de selección adicionales, concretamente trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano; hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman & Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047); y ODC (ornitina descarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de la ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue L., 1987, En: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.).

Pueden usarse varios factores tumoricidas o de susceptibilidad, en la práctica de la invención. Dichos factores están definidos como aquellos que confieren a las células sensibilidad a agentes quimioterapéuticos. En una realización particular de la invención, el

gen HSV-TK se inserta en un vector retroviral recombinante. La región codificante de HSV-TK puede obtenerse de una diversidad de clones disponibles al público (Wigler *et al.* 1977, Cell 11:223). La infección de células tumorales con dichos vectores retrovirales confiere a esas células sensibilidad a fármacos tales como aciclovir y ganciclovir.

De acuerdo con la invención, las secuencias nucleotídicas que codifican factores tumorocidas o de susceptibilidad pueden asociarse de forma operativa con señales promotoras-potenciadores de LTR retrovirales. Una unión operativa es una en la que las secuencias promotoras/potenciadoras de LTR y el gen tumorocida o de susceptibilidad están asociadas de un modo tal para permitir la expresión génica. Como alternativa, los especialistas en la técnica pueden utilizar otras secuencias promotoras/potenciadoras igual de bien para proporcionar transcripción de las secuencias insertadas. Por ejemplo, pueden usarse elementos promotores/potenciadores aislados del genoma de células de mamífero, de virus permisivos para el crecimiento en células de mamífero, o producidos por técnicas de ADN recombinante o sintéticas para proporcionar transcripción del gen que codifica el factor tumorocida o de susceptibilidad. Puede usarse cualquiera de varios elementos promotores/potenciadores adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles, en los vectores de expresión.

También pueden incluirse señales de inicio específicas necesarias para una traducción eficaz del gen insertado en los vectores de expresión retrovirales. Estas secuencias de control de la traducción exógenas que pueden incluir un codón de inicio ATG y secuencias adyacentes pueden ser de una diversidad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. En casos en los que el gen tumorocida o de susceptibilidad completo, incluyendo su propio codón de inicio y secuencias adyacentes, se inserta en el vector de expresión apropiado, puede que no se necesiten señales de traducción adicionales. Sin embargo, en casos en los que se inserta solamente una parte de la secuencia codificante tumorocida o de susceptibilidad, las señales de control de la traducción exógenas, incluyendo el inicio ATG, deben estar en fase con la fase de lectura de la secuencia codificante tumorocida o de susceptibilidad para asegurar la traducción del inserto completo. La eficacia de la expresión puede potenciarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción, terminadores de la transcripción, etc. apropiados (véase, Bitter *et al.*, 1987, Methods in Enzymol. 153:516-544).

En una realización específica descrita en este documento, se transfectaron células productoras con un vector retroviral modificado genéticamente para contener el gen que codifica la fosfatasa alcalina, bajo el control de la LTR del vector y resistencia a G418 dirigido por el promotor SV40. Las células productoras transfectadas se unieron a microvehículos de dextrano recubiertos con colágeno seguido de trasplante en el cerebro de la rata. Los estudios histológicos realizados 30 días después del implante indicaron una expresión a largo plazo del gen de la fosfatasa alcalina en células infectadas de forma retroviral.

Aunque los vectores retrovirales recombinantes son los vectores preferidos para su uso en el método de la presente invención, también pueden usarse otros vectores virales para expresar genes tumorocidas o de susceptibilidad. Por ejemplo, pueden usarse adenovi-

rus, virus adeno-asociados, virus de Epstein-Barr, papilomavirus, virus vaccinia, herpesvirus y otros virus humanos y animales para expresar factores tumorocidas o de susceptibilidad en células a transplantar en el cerebro de un mamífero. Por ejemplo, en casos en los que se usa un adenovirus como vector de expresión, puede ligarse la secuencia codificante del factor tumorocida o de susceptibilidad a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico después puede insertarse en el genoma de adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 y E3) producirá un virus recombinante que es viable y capaz de expresar genes tumorocidas o de susceptibilidad en células hospedadoras infectadas (por ejemplo, véase Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:3655-3659).

5.2. Líneas celulares de empaquetado

Para producir partículas retrovirales transmisibles, se transfectan los vectores de expresión retrovirales recombinantes en líneas celulares "productoras" estables. Las líneas celulares productoras contienen un provirus integrado de forma estable que expresa todas las funciones retrovirales necesarias en *trans* para empaquetar los transcritos virales en partículas de virus maduro. Estas incluyen los genes del antígeno específico de grupo (*gag*), envuelta (*env*) y polimerasa (*pol*). El gen *gag* codifica las proteínas estructurales internas (nucleocápsida); el gen *pol* codifica la ADN polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa inversa); y el gen *env* codifica las glicoproteínas de la envuelta viral. Una característica esencial del provirus integrado de forma estable es la ausencia de secuencias de empaquetado (las secuencias *psi*) que normalmente proporcionan las señales necesarias en *cis* para empaquetar transcritos virales. Por lo tanto, los transcritos que surgen de la expresión del provirus no se empaquetan en partículas virales, sino que en su lugar, proporcionan en *trans* los productos génicos necesarios para empaquetar partículas virales.

Como los vectores retrovirales requieren la división celular y la síntesis de ADN para una infección eficaz, la integración y expresión génica, las células "productoras" son preferiblemente células de crecimiento activo. Dichas células productoras pueden incluir fibroblastos, neuronas, células gliales, queratinocitos, hepatocitos, o cualquier otra célula de mamífero capaz de transfectarse e implantarse usando los métodos de la presente invención.

Puede emplearse una diversidad de líneas celulares productoras para su uso en el método de la presente invención. Por ejemplo, pueden utilizarse las líneas celulares productoras retrovirales ya existentes en la práctica de la invención. Dichas líneas celulares pueden incluir la línea celular BOSC23 (Pear, W.S. *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:8392-8396), Psi2 (Cone, R.D. *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6349-6353), Psi am (Hartley, J.W. *et al.*, 1976, Journal of Virology 19:19-25) o cualquier otra línea celular productora funcionalmente equivalente que proporcione productos génicos en *trans* necesarios para el empaquetado viral.

Como alternativa, pueden generarse nuevas líneas celulares productoras adicionales. Para crear líneas celulares productoras adicionales, se introducen por transfección vectores retrovirales que sintetizan todas

las proteínas necesarias en *trans* para el ensamblaje viral en células de crecimiento activo. Puede utilizarse una diversidad de técnicas de transfección que son bien conocidas para los especialistas en la técnica, para transferir los vectores de expresión retrovirales en líneas celulares productoras. Dichas técnicas incluyen precipitación de ADN con fosfato cálcico, transfección por DEAE-Dextrano, electroporación, o transferencia de ADN mediada por liposomas.

Las células productoras se transfectaron posteriormente con los vectores retrovirales recombinantes que contenían los genes tumoricidas o de susceptibilidad y, opcionalmente, ADN que codifica un marcador de selección. En casos en los que los vectores recombinantes contienen un marcador de selección, puede realizarse una selección de células transfectadas antes del implante.

5.3. Cultivo *in vitro* de líneas celulares de empaquetado

Para aumentar la viabilidad a largo plazo de las células productoras transplantadas, primero se unen las células productoras *in vitro* sobre una matriz de soporte. Los materiales de los que puede estar comprendida la matriz de soporte incluyen los materiales a los que se adhieren las células después de incubación *in vitro*, y sobre los que pueden crecer las células, y que pueden implantarse en el cerebro de un mamífero sin producir una reacción tóxica, o una reacción inflamatoria que destruiría las células implantadas o impediría de otro modo la actividad biológica o terapéutica. Dichos materiales pueden ser sustancias químicas sintéticas o naturales o sustancias que tengan un origen biológico. Los materiales de matriz incluyen, aunque sin limitación, vidrio y otros óxido de silicio, poliestireno, polipropileno, polietileno, fluoruro de polivinilideno, poliuretano, polialginato, polisulfona, alcohol polivinílico, polímeros de acrilonitrilo, poliacrilamida, policarbonato, polipenteno, nylon, amilasas, gelatina, colágeno, polisacáridos naturales o modificados, incluyendo dextranos y celulosas (por ejemplo, nitrocelulosa), agar, y magnetita. Pueden usarse materiales reabsorbibles o no reabsorbibles. También se proponen materiales de matriz extracelular, que son bien conocidos en la técnica. Los materiales de matriz extracelular pueden obtenerse en el mercado o prepararse cultivando células que secretan dicha matriz, retirando las células secretoras, y permitiendo que las células a transplantar interaccionen con y se adhieran a la matriz. El material de matriz sobre el que crecen las células a implantar, o con el que se mezclan las células, puede ser un producto autóctono de las propias células productoras implantadas. Por tanto, por ejemplo, el material de matriz puede ser matriz extracelular o material de membrana basal que se produce y secreta por las células productoras a implantar.

Para mejorar la adhesión celular, la supervivencia y la función, la matriz sólida puede recubrirse opcionalmente en su superficie externa con factores conocidos en la técnica por promover la adhesión celular, crecimiento o supervivencia. Dichos factores incluyen moléculas de adhesión celular, matriz extracelular, tales como, por ejemplo, fibronectina, laminina, colágeno, elastina, glicosaminoglicanos, o proteoglicanos o factores de crecimiento, tales como, por ejemplo, factor de crecimiento de nervios (NGF). Como alternativa, si la matriz sólida a la que se unen las células implantadas se construye de material poroso, el factor o factores promotores del crecimiento o super-

vivencia pueden incorporarse en el material de matriz, del que se liberarían lentamente después del implante *in vivo*.

Cuando están unidas al soporte de acuerdo con la presente invención, las células usadas para el transplante generalmente serán de la "superficie externa" del soporte. El soporte puede ser sólido o poroso. Sin embargo, incluso en un soporte poroso, las células están en contacto directo con el medio externo sin una membrana intermedia u otra barrera. Por tanto, de acuerdo con la presente invención, se considera que las células están en la "superficie externa" del soporte aunque la superficie a la que se adhieren puede estar en forma de pliegues o circunvoluciones internas del material de soporte poroso que no están en el exterior de la partícula o la propia perla.

La configuración del soporte es preferiblemente esférica, como en una perla, pero puede ser cilíndrica, elíptica, una lámina plana o tira, una aguja o forma de alfiler, y similares. Una forma preferida de matriz de soporte es una perla de vidrio. Otra perla preferida es una perla de poliestireno. Los tamaños de perla pueden variar de aproximadamente 10 μm a 1 cm de diámetro, preferiblemente de aproximadamente 90 a aproximadamente 150 μm . Para una descripción de diversas perlas de microvehículo, véase, por ejemplo, *Fisher Biotech Source 87-88*, Fisher Scientific Co., 1987, páginas 72-75; *Sigma Cell Culture Catalog*, Sigma Chemical Co., St. Louis, 1991, páginas 162-163; *Ventrex Product Catalog*, Ventrex Laboratories, 1989; incorporándose estas referencias por la presente como referencia. El límite superior en el tamaño de perla está impuesto por la estimulación por parte de la perla de reacciones del hospedador no deseadas tales como gliosis, que puede impedir la función de las células transplantadas o causar daño al tejido cerebral adyacente. Los especialistas en la técnica pueden determinar fácilmente dichas limitaciones.

5.4. Transplante de células de empaquetado

Las células productoras que expresan los genes tumoricidas o de susceptibilidad se cultivan *in vitro* y se unen a una matriz de soporte. El método de la presente invención incluye el injerto intracerebral de células productoras que contienen el gen terapéutico de interés en el área del cerebro afectada por el tumor. Los métodos para transplantar células en el cerebro se describen en *Neural Grafting in the Mammalian CNS*, 1985, Bjorklund y Stenevi, eds y Gage *et al.*, Brain Research, cada uno de los cuales se incorpora en este documento como referencia. Los procedimientos para transplantar células en el cerebro incluyen:

1) inyectar las células productoras en el cerebro del hospedador o

2) preparar una cavidad por un medio quirúrgico para depositar las células productoras.

Las células productoras pueden inyectarse en regiones seleccionadas en el cerebro en cercana proximidad al área del tumor cerebral. Las células productoras se introducen en una jeringa y se administran al paciente. Pueden hacerse múltiples inyecciones en el área del tumor. Como alternativa, puede prepararse quirúrgicamente una cavidad adyacente al área del cerebro afectada por el tumor y las células productoras se pueden depositar en la cavidad.

La cantidad de células necesaria para conseguir los propósitos de la presente invención es variable dependiendo del tamaño, edad, peso del sujeto y tamaño del tumor cerebral. La cantidad de células puede de-

terminarse por un especialista en la técnica sin experimentación excesiva. En una realización de la invención, descrita en este documento, las células productoras modificadas genéticamente, unidas a una matriz de soporte, se implantaron en los cerebros de ratas. Los estudios histológicos indican que la expresión génica mediada por retrovirus podría detectarse 30 días después del trasplante, lo que indica la expresión exitosa a largo plazo de genes retrovirales.

Habiendo descrito ahora la invención en líneas generales, se entenderá la misma más fácilmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo de ilustración, y no pretenden ser limitantes de la presente invención, salvo que se especifique.

6. Ejemplo

Gen mediado por retrovirus a largo plazo en el cerebro de un mamífero

La siguiente subsección describe el trasplante de células productoras, unidas a una matriz de soporte, en los cerebros de ratas. Las células productoras transplantadas producen partículas retrovirales infecciosas que se han modificado genéticamente para expresar el gen de la fosfatasa alcalina. Los resultados demuestran la expresión exitosa a largo plazo del gen de la fosfatasa alcalina en el cerebro del animal transplantado.

6.1. Materiales y métodos

6.1.1. Animales y preparación celular

Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley (SD) macho de Taconic Farms (Germantown, NY) a un peso de 120-150 g. La línea celular Bing es un equivalente anatómico de la línea celular BOSC23 (W. Pear, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 90, 8392-8396, 1993) aislada de la línea de células de riñón embrionario humano 293T (293tsa1609neo) (R.B. DuBridge, *et al.*, Mol. Cell Biol. 7, 379-387, 1987) que produjo sobrenadantes retrovirales capaces de infectar células NIH3T3 a títulos superiores a 10^6 /ml después de transfección transitoria. En la línea celular Bing, se introdujeron construcciones retrovirales anfotrópicas para empaquetar vectores retrovirales deficientes en la replicación, tales como los vectores retrovirales basados en LXS_N. Las líneas celulares se mantuvieron en medio DMEM con alto contenido de glucosa suplementado con suero de ternera fetal al 10% (Hyclone) y antibióticos (solución de penicilina-estreptomina, Sigma).

El vector de fosfatasa alcalina se basa en la construcción retroviral LNSX (A.D. Miller, Human Gene Ther., 1, 5-14, 1990). Contiene genes que codifican la fosfatasa alcalina, bajo el control de la LTR del vector y resistencia a G418 dirigido por el promotor SV40.

Para realizar la transfección, se transfectaron 10^7 células Bing sembradas en una placa petri p100 con $10 \mu\text{g}$ del plásmido de fosfatasa alcalina (purificado en una columna Quiagen Maxi-prep de acuerdo con las instrucciones del fabricante) usando el protocolo de transfección con fosfato cálcico convencional (J. Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning, 2a ed).

Las células se recolectaron setenta y dos horas después de la transfección, se alicuotaron en suero de ternera fetal con DMSO al 10% (Sigma) y se sembraron en placas a -70°C para un almacenamiento a largo plazo. Una parte de las células transfectadas se transfirió sobre portaobjetos de vidrio, se fijó con paraformaldehído al 2% y se tiñó durante 1 hora con Nitroazul de Tetrazolio (Sigma) a pH 8,5. Se observó tinción positiva para fosfatasa alcalina en el 30% de

las células Bing transfectadas con el vector de fosfatasa alcalina; no se observó tinción específica en las células Bing no infectadas, de control.

6.1.2. Unión de células a microvehículos

Antes de la unión a los microvehículos, las células se lavaron tres veces en PC-1 (Hycor), un medio libre de suero, y se resuspendieron en PC-1. Los microvehículos de dextrano recubiertos con colágeno (Cytodex[®] 3, 100-200 μm) se esterilizaron colocando las perlas en 10 ml de agua destilada estéril por 1 gramo de perlas y calentado a 121°C durante 15 minutos. La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se desechó el agua. Después se resuspendieron los microvehículos en un pequeño volumen de medio de cultivo y se dejaron reposar durante 30 minutos. Se retiró el medio y se añadieron las perlas (aproximadamente 0,21 g) a la preparación celular previamente descrita. La mezcla resultante se agitó durante 2 horas y se añadieron 4 ml adicionales de PC-1. El matraz de cultivo se incubó después con mezcla periódica durante una noche para permitir que las células se adhirieran a los microvehículos. Después de la incubación y antes del implante, se tomó una alícuota y se hizo reaccionar con azul de Tripiano para determinar la viabilidad celular y se determinó la cantidad de células unidas a los microvehículos por examen microscópico. Este procedimiento produjo la unión de aproximadamente 5 a 7 células a cada microvehículo con una viabilidad celular del 95% o mejor.

6.1.3. Administración de células

Se anestesió a los animales usando pentobarbital sódico (40 mg/kg, ip) y se realizó la cirugía en condiciones asépticas. Las células se inyectaron en la región del caudado/putamen del cerebro usando una inyección estereotáxica. Se implantó a cada uno de cuatro grupos de tres animales 1) células no transfectadas solas, 2) células no transfectadas en microvehículos, 3) células transfectadas solas, y 4) células transfectadas en microvehículos. Este implante se colocó (después de la corrección) a 1,5 mm anterior al bregma, 2,0 mm lateral y 5,0 mm por debajo de la superficie de la dura. La barra de mordaza estaba a -3,3 mm. Se corrigieron las coordenadas estereotáxicas para el animal individual usando la posición directamente sobre el bregma como las coordenadas en valor cero. Los valores dorso-ventrales eran de la superficie de la dura madre. Una vez que se había colocado apropiadamente la aguja, las células se inyectaron a una velocidad de $1 \mu\text{l}/\text{min}$ hasta que se hubo inyectado un volumen final de $5 \mu\text{l}$. Se insertó un estilete de ajuste estrecho en el orificio de la aguja para empujar las perlas residuales que pudieran haberse adherido a la aguja. Se cerró el sitio quirúrgico usando grapas para heridas Clay-Adams de 9 mm.

6.1.4. Estudio histológico

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico, 60 mg/kg i.p. y se perfundió a los animales con 400 ml de solución salina tamponada con fosfato heparinizada seguido de perfusión con 400 ml de glutaraldehído al 1%/paraformaldehído al 4%/Na Fosfato 0,1 M, pH 7,2. Se retiraron los cerebros y se colocaron en sacarosa al 30% en PBS y se prepararon secciones congeladas de 28 μm o 50 μm . Las secciones se transfirieron a tubos de ensayo enumerados que contenían PBS, se colocaron en portaobjetos recubiertos con gelatina y se tiñeron para fosfatasa alcalina por reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente con 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil fosfato/yodonitrotetrazolio

(BCIP/INT) (Biomedica, Foster City, CA) que produce un producto de reacción marrón. Se realizó una histología de rutina en secciones de parafina de 10 μm teñidas con hematoxilina y eosina.

6.2. Resultados

Los animales se sacrificaron 30 días después del implante y se realizaron los estudios histológicos. Las Figuras 1-3 ilustran los resultados obtenidos en estos estudios.

Las secciones de los cerebros de las ratas a las que se les había implantado células no transfectadas sin microvehículos no mostraron material positivo a BCIP/INT. Las secciones, tomadas en el sitio transplantado, de los cerebros de las ratas a las que se les había administrado células transfectadas implantadas sin microvehículos mostraron poco o ningún material positivo a BCIP/INT (Figura 2).

Para descartar la posibilidad de que los propios microvehículos produjeran un artefacto de tinción, también se examinaron células no transfectadas implantadas en microvehículos. La Figura 1 muestra una sección típica tomada en el sitio del implante. La

ausencia de tinción por el cromógeno BCIP/INT indica que los microvehículos Cytodex[®] no contribuyen al patrón de tinción observado en la Figura 3.

Cuando las células se implantaron con microvehículos Cytodex[®] y se realizó la histología 30 días después, surgió un patrón diferente. La Figura 3 muestra una sección a aumento 20x del cerebro de una rata a la que se le ha implantado 30 días antes células CaK8p7 transfectadas con el plásmido del gen de la fosfatasa alcalina. La tinción con BCIP/INT revela numerosas células en o cerca de la superficie de la perla que son positivas para la fosfatasa alcalina. Esto está en claro contraste con las células implantadas sin los microvehículos (Figura 2).

Los resultados obtenidos en estos estudios demuestran que la preadhesión de las células a microvehículos antes del implante potencia la viabilidad de las células implantadas y prolonga la ventana terapéutica de terapia génica. Cuando se aplica a la metodología de células productoras, esta respuesta prolongada debe maximizar su eficacia terapéutica aumentando el suministro del gen al SNC.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Una matriz de soporte que tiene una célula productora de partículas virales adherida a la superficie de la misma, habiéndose introducido en dicha célula un vector de expresión viral que tiene una secuencia nucleotídica que codifica un factor tumorocida o de susceptibilidad, para transferir el factor tumorocida o de susceptibilidad en células tumorales en un cerebro de mamífero, injertando la matriz de soporte en la proximidad de las células tumorales, donde después del injerto, existe una expresión a largo plazo del factor tumorocida o de susceptibilidad en la célula productora de partículas virales.

2. Una matriz de soporte de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la célula productora es una célula productora de partículas retrovirales, habiéndose introducido dicha célula un vector de expresión retroviral.

3. Una matriz de soporte de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el vector retroviral contiene señales de empaquetado intactas.

4. Una matriz de soporte de acuerdo con la reivindicación 2 o reivindicación 3, en la que el vector retroviral contiene un gen marcador de selección.

5. Una matriz de soporte de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la célula productora contiene un provirus que carece de una secuencia señal de empaquetado necesaria para la encapsidación de transcritos de ARN del provirus en partículas de virus maduro.

6. Una matriz de soporte de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que la célula productora es BOSC 23, Psi 2 o Psi Am.

7. Una matriz de soporte de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el vector viral es un vector de adenovirus o un vector de virus adeno-asociado.

8. Una matriz de soporte de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la secuencia nucleotídica que codifica el factor tumorocida o de susceptibilidad codifica la timidina quinasa del herpes simple.

9. Una matriz de soporte de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la secuencia nucleotídica que codifica el factor tumorocida o de susceptibilidad codifica el gen de la citosina desaminasa.

10. Una matriz de soporte de acuerdo con cual-

quiera de las reivindicaciones precedentes, siendo dicha matriz de soporte una microperla porosa o no porosa.

11. Una matriz de soporte de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicha microperla tiene un diámetro de aproximadamente 90 μm a aproximadamente 150 μm .

12. Una matriz de soporte de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, estando fabricada dicha matriz de soporte de un material seleccionado entre óxido de silicón, poliestireno, polipropileno, polietileno, policarbonato, polipenteno, polímero de acrilonitrilo, nylon, polisacárido natural, polisacárido modificado, amilosa, gelatina, colágeno, agar, magnetita, ácido hialurónico y matriz extracelular.

13. Una matriz de soporte de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la célula productora es una línea celular generada introduciendo de forma estable en una célula hospedadora de mamífero, un vector retroviral que carece de una secuencia señal de empaquetado necesaria para la encapsidación de los transcritos de ARN de provirus en partículas de virus maduro.

14. Uso de una matriz de soporte que tiene una célula productora de partículas virales adherida a la superficie de la misma, habiéndose introducido en dicha célula un vector de expresión viral que tiene una secuencia nucleotídica que codifica un factor tumorocida o de susceptibilidad, para la fabricación de un medicamento para transferir el factor tumorocida o de susceptibilidad en células tumorales en un cerebro de mamífero injertando la matriz de soporte en proximidad a las células tumorales, donde después del injerto, existe una expresión a largo plazo del factor tumorocida o de susceptibilidad en la célula productora de partículas virales.

15. Uso de una matriz de soporte de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la célula productora es una célula productora de partículas retrovirales, habiéndose introducido en dicha célula un vector de expresión retroviral.

16. Una composición farmacéutica que comprende una matriz de soporte con una célula productora de partículas virales asociada, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

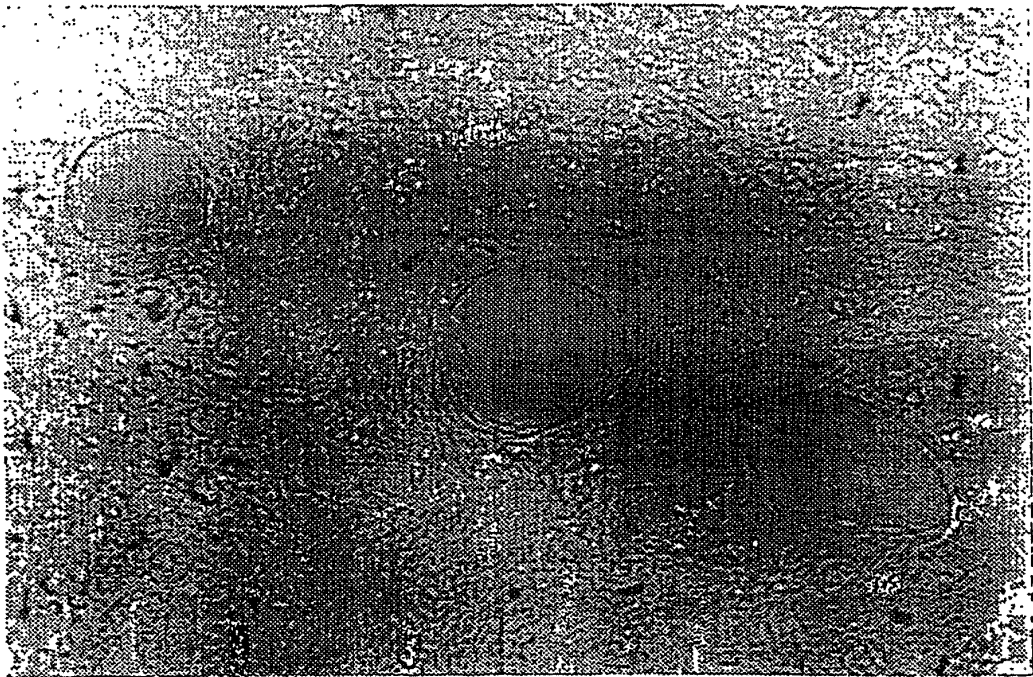


FIG. 1

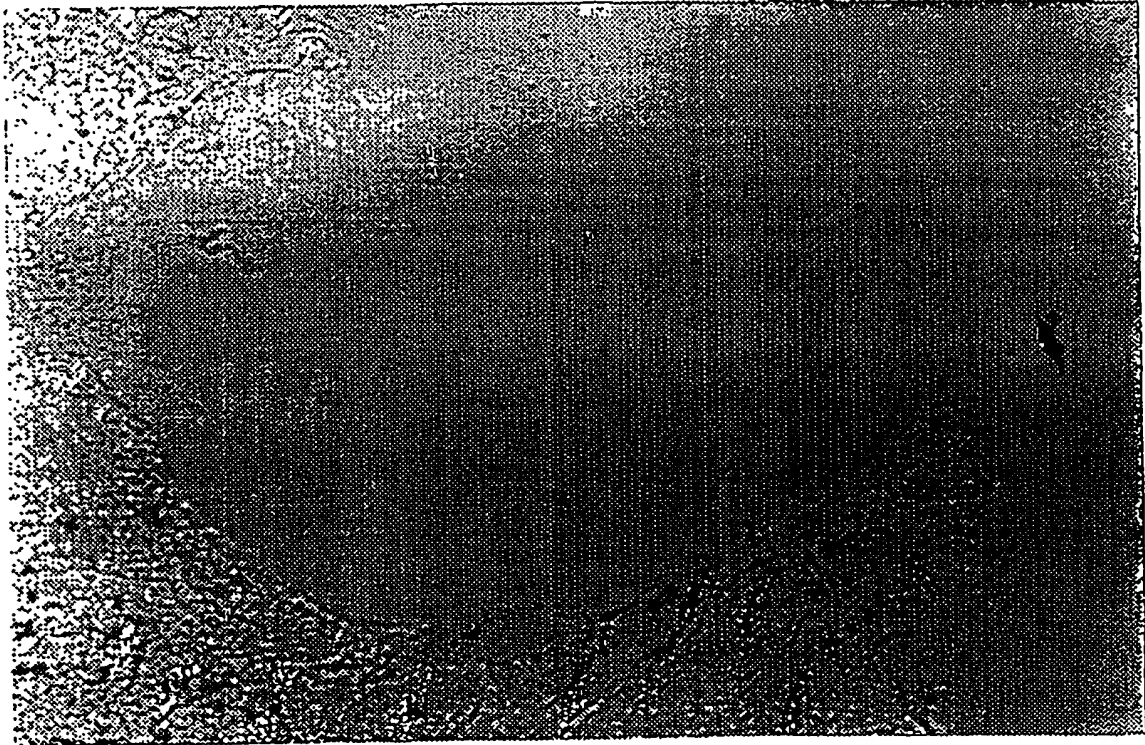


FIG.2

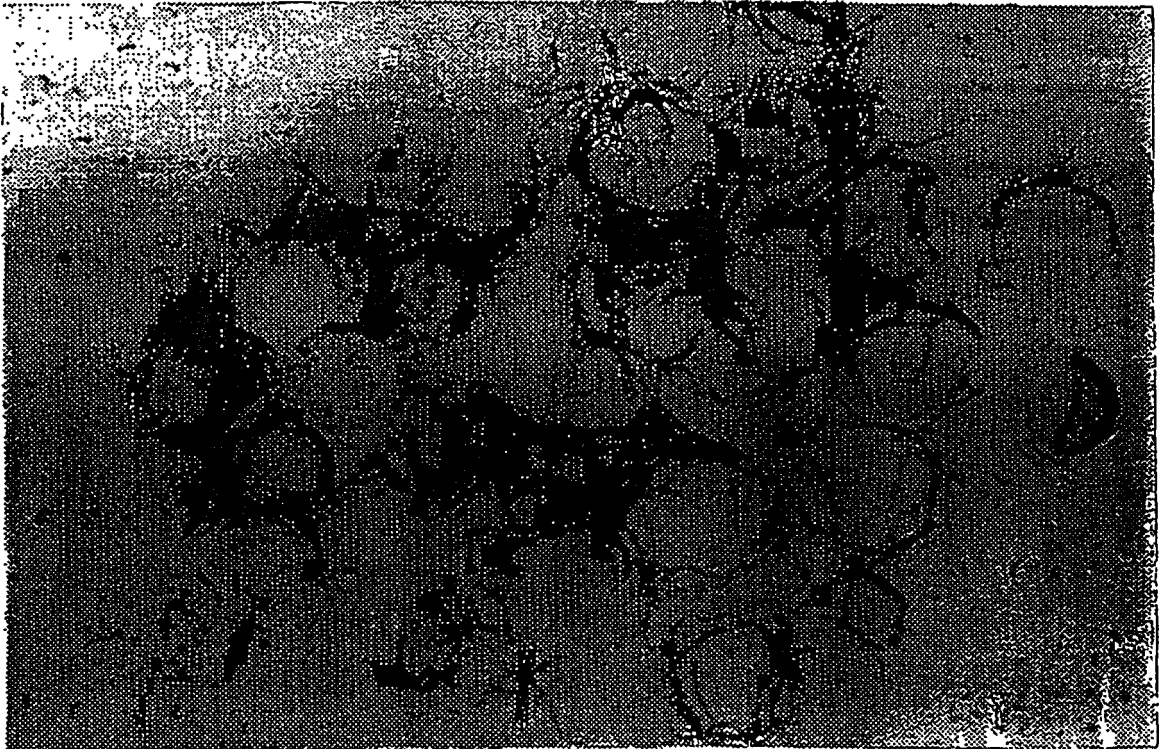


FIG.3