



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 301 602**

51 Int. Cl.:  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 35/12** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02075756 .3**  
86 Fecha de presentación : **26.06.1992**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1213032**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.06.2002**

54 Título: **Uso de un ADN o ARN para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de células tumorales.**

30 Prioridad: **28.06.1991 US 724509**  
**26.07.1991 US 741244**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.07.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.07.2008**

73 Titular/es:  
**The Regents of the University of Michigan**  
**475 East Jefferson, Room 2354**  
**Ann Arbor, Michigan 48109-1248, US**

72 Inventor/es: **Nabel, Elizabeth G. y**  
**Nabel, Gary J.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 301 602 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

Uso de un ADN o ARN para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de células tumorales.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso de ADN o de ARN para modular el sistema inmune de un animal, mediante la introducción *in vivo* de genes recombinantes.

10 **Técnica anterior**

El tratamiento eficaz de muchas enfermedades adquiridas y hereditarias sigue siendo un desafío importante para la medicina moderna. La capacidad para entregar agentes terapéuticos en sitios específicos *in vivo*, debería ser un recurso en el tratamiento, p. ej., de enfermedades localizadas. Además, la capacidad para hacer que un agente terapéutico perfunda a través del sistema circulatorio, sería eficaz para el tratamiento, p. ej., de enfermedades hereditarias y de enfermedades adquiridas o cánceres.

Por ejemplo, sería deseable administrar de forma constante un agente antitumoral o una toxina en las cercanías de un tumor. De forma similar, sería deseable perfundir, p. ej., insulina en la sangre de una persona que padece diabetes. Sin embargo, para muchos agentes terapéuticos no existe un método satisfactorio de administración que sea específico del sitio o sistémico.

Además, en muchas enfermedades sería deseable provocar la expresión de un gen endógeno defectuoso de forma local o sistémica, la expresión de un gen exógeno o la supresión de un gen endógeno. De nuevo, esto sigue siendo una meta no realizable.

En particular, la patogénesis de la aterosclerosis se caracteriza por tres procesos biológicos fundamentales. Estos son: 1) la proliferación de las células del músculo liso de la capa íntima junto con macrófagos acumulados; 2) la formación de grandes cantidades de una matriz de tejido conectivo por las células que han proliferado del músculo liso; y 3) la acumulación de lípidos, principalmente en forma de ésteres de colesterol y de colesterol libre, dentro de las células, así como en la proximidad del tejido conectivo.

La lesión de las células endoteliales es un suceso inductor y se manifiesta por una interferencia con la barrera permeable del endotelio, alteraciones en las propiedades no trombogénicas de la superficie endotelial y colaboración con las propiedades procoagulantes del endotelio. Los monocitos migran entre las células endoteliales, se vuelven activos como células fagocitarias y se diferencian en macrófagos.

A continuación los macrófagos sintetizan y secretan factores de crecimiento que incluyen el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ). Estos factores de crecimiento son extremadamente potentes estimulando la migración y la proliferación de fibroblastos y de células del músculo liso en la placa aterosclerótica. Además, las plaquetas pueden interactuar con la célula endotelial lesionada y el macrófago activado, para potenciar la elaboración de factores de crecimiento y la formación de trombos.

Dos problemas fundamentales en el tratamiento clínico de la enfermedad coronaria incluyen la formación de trombos en la isquemia aguda de miocardio y la restenosis posterior a una angioplastia coronaria (PTCA). Ambos implican sucesos celulares comunes que incluyen la lesión endotelial y que los macrófagos y las plaquetas activados liberen factores de crecimiento potentes. La angioplastia coronaria produce la fractura de la placa aterosclerótica y la eliminación del endotelio. Este trauma vascular favorece la agregación plaquetaria y la formación de trombos en el sitio de la PTCA. Una liberación adicional de mitógenos procedentes de las plaquetas y los macrófagos, la proliferación de las células del músculo liso y la infiltración de monocitos, dan como resultado una restenosis.

La terapia empírica con fármacos antiplaquetarios no ha evitado estos problemas, que aparecen en un tercio de los pacientes que padecen PTCA. Una solución para la restenosis es evitar la agregación plaquetaria, la formación de trombos y la proliferación de las células del músculo liso.

La formación de trombos también es un suceso celular decisivo en la transición de síndromes coronarios estables a inestables. La patogénesis implica más probablemente una lesión aguda de las células endoteliales y o una ruptura de la placa, favoreciendo la separación de la adhesión de las células endoteliales lo que conduce a una exposición de las células espumosas de los macrófagos subyacentes. Esto ofrece una oportunidad a las plaquetas circulantes para adherirse, agregarse y formar trombos.

La administración por vía intravenosa de agentes trombolíticos, tales como el activador del plasminógeno tisular (tPA), da como resultado la lisis de los trombos en aproximadamente 70% de los pacientes que padecían un infarto agudo de miocardio. Sin embargo, aproximadamente el 30% de los pacientes no consigue la reperusión y de los pacientes que tienen una reperusión inicial de la arteria relacionada con el infarto, aproximadamente el 25% sufre una trombosis recurrente en las 24 horas siguientes. Por tanto, una terapia eficaz contra la retrombosis sigue siendo un desafío terapéutico importante, de cara a la actual comunidad médica.

Tal y como se ha indicado anteriormente, una terapia eficaz contra la retrombosis no es ni mucho menos el único desafío terapéutico importante que existe en la actualidad. Otros incluyen el tratamiento de otros estados isquémicos, que incluyen la angina inestable, el infarto de miocardio o la isquemia crónica tisular o incluso el tratamiento de enfermedades adquiridas o hereditarias o de cánceres. Estas se pueden tratar mediante la administración eficaz a un paciente de anticoagulantes, vasodilatadores, angiogénicos, factores de crecimiento o inhibidores del crecimiento. Por tanto, sigue habiendo una gran necesidad de una terapia eficaz en todos estos ámbitos clínicos.

Además, sería deseable poder modular el sistema inmune de un animal. En particular, se está realizando un gran esfuerzo para el desarrollo de vacunas para proporcionar una protección inmunológica frente a infecciones. Sin embargo, el desarrollo de vacunas seguras que puedan administrarse fácilmente a un gran número de pacientes, es problemático y para muchas enfermedades, tales como, p. ej., el SIDA, todavía no está disponible una vacuna segura y eficaz. Además, también es deseable a veces evitar específicamente la respuesta inmune en un animal, para evitar el rechazo a los trasplantes. Los esfuerzos para suprimir el rechazo de trasplantes han dado como resultado el desarrollo de fármacos que conducen a una supresión general de la respuesta inmune, más que a una supresión específica de los antígenos del trasplante y dichos fármacos no son siempre eficaces. Por tanto, sigue existiendo una necesidad de un método para modular el sistema inmune de un animal.

En el documento WO 90/11734 se describe un método para tratar una enfermedad en un paciente, provocando que una célula adherida a las paredes de un vaso o las células de un órgano perfundido con este vaso en el paciente, expresen una proteína exógena terapéutica.

### Descripción de la invención

Por tanto, un objeto de la presente descripción es proporcionar un método nuevo para administrar un agente terapéutico de forma específica del sitio

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para la perfusión de un agente terapéutico en el caudal sanguíneo de un paciente.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para provocar la expresión de un gen exógeno en un paciente.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para provocar la expresión de un gen endógeno defectuoso en un paciente.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para suprimir la expresión de un gen endógeno en un paciente.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para sustituir células dañadas en un paciente, de forma específica del sitio.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para tratar una enfermedad, provocando la administración específica del sitio de un agente terapéutico o la perfusión de un agente terapéutico en el caudal sanguíneo de un paciente.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para el tratamiento de una enfermedad, provocando la expresión de un gen exógeno, la expresión de un gen endógeno defectuoso o la supresión de la expresión de un gen endógeno en un paciente.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para el tratamiento de una enfermedad mediante la sustitución de forma específica del sitio de las células dañadas en un paciente.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un equipo de reactivos para instilar de forma específica del sitio, las células normales o transformadas en un paciente.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un equipo de reactivos para transformar de forma específica del sitio, células transformantes *in vivo*.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para modular el sistema inmune de un animal.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para modular el sistema inmune de un animal para sensibilizar al animal frente a una molécula ajena.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para estimular el sistema inmune de un animal, para rechazar proteínas de modo que se proporcione una protección contra la infección con un microorganismo o un virus.

## ES 2 301 602 T3

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para modular el sistema inmune de un animal para que el animal sea tolerante con una molécula ajena.

5 Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para modular el sistema inmune de un animal para reducir la tendencia a rechazar un trasplante.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un nuevo equipo de reactivos para transformar células mediante la administración sistémica *in vivo*.

10 Estos y otros objetos de esta descripción que serán evidentes durante el curso de la siguiente descripción detallada, han sido descubiertos por los inventores para conseguir (a) un método que comprende (i) la instilación específica del sitio de células normales (no transformadas) o transformadas, en un paciente o (ii) la transformación específica del sitio de células en un paciente y (b) un equipo de reactivos que contiene un catéter para (i) la instilación específica del sitio de células normales o transformadas o (ii) la transformación específica del sitio de las células.

15 La instilación específica del sitio de células normales, se puede emplear para sustituir células dañadas, mientras que la instilación de células transformadas se puede utilizar para provocar la expresión de un gen endógeno defectuoso o de un gen exógeno o la supresión de un producto génico endógeno. La instilación de células en las paredes de los vasos sanguíneos de un paciente, se puede utilizar para provocar la perfusión constante de un agente terapéutico en el  
20 caudal sanguíneo.

Los inventores también han descubierto que transformando las células de un animal, *in vivo*, es posible modular el sistema inmune del animal. En particular, transformando las células de un animal con un gen recombinante, mediante  
25 administración específica del sitio o sistémica, es posible modular el sistema inmune del animal para sensibilizar al animal hacia la molécula que es codificada por el gen recombinante. Alternativamente, transformando las células de un animal con un gen recombinante, específicamente en un sitio que determine la especificidad del sistema inmune, tal como, p. ej., el timo, es posible modular el sistema inmune de un animal para suprimir la respuesta inmune hacia la molécula codificada por el gen recombinante.

30 De cara a lo expuesto anteriormente y basándose en la descripción contenida en esta memoria, la presente invención proporciona el uso de una secuencia de ADN o de ARN y de un vehículo para la secuencia, seleccionado a partir del grupo consistente en vectores víricos que facilitan la entrega *in vivo* de la secuencia a las células tumorales, para la fabricación de un medicamento para tratar un tumor en un mamífero mediante la inyección directa del medicamento en el tumor o en el sitio del tumor, de modo que las células tumorales sean transformadas, en donde la secuencia de  
35 ADN o de ARN es un miembro seleccionado entre el grupo consistente en las secuencias de ADN o de ARN que codifican agentes estimulantes/inhibidores del sistema inmune y del crecimiento, que incluyen agentes inductores de la diferenciación, tales como agentes estimulantes que incluyen la interleucina-2, la interleucina-3, la interleucina-4, la interleucina-6, agentes inhibidores/inductores de la diferenciación, tales como TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, interleucina-1 e interferones.

40 Se conseguirá una apreciación más completa de la invención y muchas de las ventajas adjuntas a la misma, a la vez que se comprenderá mejor, en relación con la siguiente descripción detallada, considerada junto con las figuras acompañantes.

### 45 Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1 y 2 ilustran el uso de un catéter para implantar células mediante cirugía o por vía percutánea en un vaso sanguíneo o para transformar células *in vivo*, presentes en la pared del vaso sanguíneo de un paciente;

50 La Figura 3 ilustra la relación entre el % de la lisis de las células diana y la proporción efector:diana para las células CTL; y

La Figura 4 ilustra los resultados de un análisis con transferencia de tipo Western.

55 Los métodos descritos en esta memoria pueden ser para tratar enfermedades, tales como enfermedades hereditarias, enfermedades sistémicas, enfermedades del sistema cardiovascular, enfermedades de órganos particulares o tumores, mediante la instilación de células normales o transformadas o mediante células transformantes.

60 Las células que se pueden instilar en los presentes métodos, incluyen las células del endotelio, del músculo liso, los fibroblastos, los monocitos, los macrófagos y las células del parénquima. Estas células pueden producir proteínas que pueden tener un efecto terapéutico o diagnóstico y que pueden estar presentes en la naturaleza o producirse a partir de material genético recombinante.

65 Haciendo ahora referencia a las figuras, en donde números de referencia iguales designan partes idénticas o correspondientes, desde diversos ángulos, y más particularmente a la Figura 1, esta figura ilustra el uso de un catéter que tiene un diseño tal y como se describe en el documento de patente de EE.UU. 4.636.195. Este catéter se puede utilizar para proporcionar células normales o genéticamente alteradas, sobre las paredes de un vaso o para introducir vectores para la transformación local de las células. En la figura, (5) es la pared del vaso sanguíneo. La figura muestra el cuerpo

del catéter (4) sostenido en su posición al inflarse los medios de globo inflables (1) y (2). La sección del cuerpo del catéter (4) situada entre los medios de globo (1) y (2), está equipada con unos medios de orificio para instilación (3). El catéter puede estar equipado adicionalmente con unos medios de guía (6). La Figura 2 ilustra el uso de un catéter similar, que se distingue del catéter ilustrado en la Figura 1, por el hecho de que está equipado sólo con un medio de globo hinchable (2) y una pluralidad de medios de orificio para la instilación 3. Este catéter puede contener hasta doce medios de orificio individuales para la instilación (3), estando 5 ilustrados.

En el caso de entrega a un órgano, el catéter se puede introducir en la arteria principal que riega el tejido. Las células que contienen genes recombinantes o vectores se pueden introducir a través de un orificio central para instilación, después de una oclusión temporal de la circulación arterial. De este modo, se pueden entregar las células o el ADN del vector a una gran cantidad de tejido parenquimatoso, distribuido a través de la circulación capilar. Los genes recombinantes también se pueden introducir en la vasculatura empleando la técnica de catéter con doble globo en la circulación arterial próxima al órgano diana. De este modo, los genes recombinantes se pueden secretar directamente en la circulación que perfunde el tejido implicado o se puede sintetizar directamente en el órgano.

En tales métodos, los agentes terapéuticos pueden ser secretados por células vasculares que suministran a los órganos específicos, afectados por la enfermedad. Por ejemplo, la cardiomiopatía isquémica se puede tratar introduciendo factores angiogénicos en la circulación coronaria. Este acercamiento también se puede utilizar para enfermedades periféricas, vasculares o cerebrovasculares en donde los factores angiogénicos pueden mejorar la circulación al cerebro o a otros tejidos. La diabetes mellitus se puede tratar mediante la introducción de células que secretan insulina que son sensibles a la glucosa en la circulación de la vena porta, en donde el hígado tiene generalmente una mayor concentración de insulina que otros tejidos.

Además de proporcionar concentraciones locales de agentes terapéuticos, el método también se puede utilizar para suministrar genes recombinantes a tejidos parenquimatosos ya que se pueden suministrar altas concentraciones de vector vírico y de otros vectores a una circulación específica. Empleando este acercamiento, también se pueden tratar deficiencias de proteínas específicas de órganos. Por ejemplo, en el hígado, la falta de inhibidor de la  $\alpha$ -antitripsina o la hipercolesterolemia, se puede tratar introduciendo  $\alpha$ -antitripsina o el gen del receptor de LDL. Además, este acercamiento se puede utilizar para tratar un cáncer. La secreción de genes recombinantes específicos de una toxina en la circulación de tumores inoperables, proporciona un efecto terapéutico. Ejemplos incluyen los neuromas acústicos o ciertos hemangiomas que de otro modo no son recuperables.

En el ámbito clínico, estos genes recombinantes terapéuticos se introducen en las células que se entregan a la circulación del órgano implicado. Aunque la circulación arterial y capilar son los lugares preferidos para introducir estas células, los sistemas venosos también son adecuados.

En esta aplicación para el tratamiento de lesiones vasculares locales, la presente descripción proporciona la expresión de proteínas que mejoran este estado *in situ*. Ya que las células vasculares se encuentran en estos sitios, se pueden utilizar como vehículos para transportar los agentes terapéuticos.

Por tanto, ciertos métodos descritos en esta memoria dependen de la alteración genética de células endoteliales y de otras células vasculares o de la terapia génica de células somáticas, para transmitir agentes terapéuticos (es decir, proteínas, factores de crecimiento) a la región localizada de la lesión vascular. Para emplear con éxito el trasplante de genes en las células, se deben cumplir cuatro requisitos. Primero, el gen que se va a implantar en la célula, se debe identificar y aislar. Segundo, el gen que se va a expresar se debe clonar y estar disponible para la manipulación genética. Tercero, el gen se debe introducir en la célula, de forma que se exprese o sea funcional. Cuarto, las células alteradas genéticamente deben estar situadas en la región vascular en la que sean necesarias.

Las células alteradas o el vector adecuado se pueden introducir quirúrgicamente, por vía percutánea o intravenosa y fijarse a una sección de una pared vascular del paciente. Alternativamente, algunas de las células existentes sobre la pared vascular del paciente se transforman con el material genético deseado o por aplicación directa del vector. En algunos casos, las células vasculares que no están modificadas genéticamente, se pueden introducir por estos métodos para sustituir células perdidas o dañadas sobre la superficie del vaso.

Cualquier vaso sanguíneo se puede tratar, es decir, las arterias, las venas y los capilares. Estos vasos sanguíneos pueden estar en cualquier órgano o próximos al mismo, en el cuerpo de un ser humano o de un mamífero.

#### *Introducción de células normales o genéticamente alteradas en un vaso sanguíneo*

Esto se puede ilustrar del modo siguiente:

##### *I. Establecimiento de células endoteliales u otras células vasculares en cultivo del tejido*

Inicialmente, se establece una línea celular y se almacena en nitrógeno líquido. Antes de la crioconservación, se toma una parte alícuota para la infección o la transfección con un vector, de tipo vírico u otro tipo, que contiene el material genético deseado.

## ES 2 301 602 T3

Las células endoteliales u otras células vasculares se pueden obtener enzimáticamente a partir de un segmento de un vaso sanguíneo, empleando técnicas descritas previamente por J. W. Ford y col., *In Vitro*, 17, 40 (1981). El vaso se escinde, se invierte sobre una varilla de acero inoxidable y se incuba en tripsina al 0,1% en solución salina equilibrada Hank's, sin  $\text{Ca}^{++}$  ni  $\text{Mg}^{++}$  (BSS) con EDTA al 0,125% a pH 8, durante 10 minutos a 37°C.

Las células ( $0,4$  hasta  $1,5 \times 10^6$ ) se recogen por centrifugación y se resuspenden en medio 199 (GIBCO) que contiene 10% de suero de bovino fetal, suplemento de factor de crecimiento de células endoteliales (ECGS, Collaborative Research, Waltham, MA) a  $25 \mu\text{g/ml}$ , heparina a  $15 \text{ U/ml}$  y gentamicina ( $50 \mu\text{g/ml}$ ). Las células se añaden a un frasco de cultivo de tejidos de  $75 \text{ cm}^2$ , revestido previamente con gelatina ( $2 \text{ mg/ml}$  en agua destilada). Se alimentó a las células cada segundo día en el medio anterior, hasta que alcanzaron confluencia.

Después de dos semanas de cultivo, se puede prescindir del ECGS y de la heparina en el medio, cuando se cultiva endotelio porcino. Si se desean células del músculo liso de los vasos o fibroblastos, se puede prescindir completamente en el proceso de cultivo de la heparina y del ECGS. Partes alícuotas de las células se almacenaron en nitrógeno líquido, resuspendiendo aproximadamente  $10^6$  células en  $0,5 \text{ ml}$  de suero de ternera fetal helado sobre hielo. Un volumen igual de suero de ternera fetal muy frío que contenía 10% de DMSO se añade y las células se transfieren a un tubo de congelamiento de Corning con tapa a rosca, enfriado previamente. Estas células se transfieren a un congelador a  $-70^\circ\text{C}$  durante 3 horas antes del almacenamiento a largo plazo en nitrógeno líquido.

Las células se infectan a continuación con un vector que contiene el material genético deseado.

### II. Introducción de células que expresan proteínas normales o exógenas en la vasculatura

#### A. Introducción de células que expresan proteínas importantes mediante cateterización

El paciente se prepara para la cateterización mediante cirugía o por vía percutánea, observando una fidelidad estricta hacia las técnicas estériles. Un proceso de remodelado se realiza sobre el vaso sanguíneo diana o se inserta una aguja en el vaso sanguíneo diana, después de anestesiarse debidamente. El vaso (5) se punza y se hace avanzar un catéter, tal y como se describe en el documento de patente de EE.UU. 4.636.195 (disponible en USCI, Billerica, MA) mediante medios de guía (6) con una orientación fluoroscópica, si es necesario, dentro del vaso (5) (Figura 1). Estos medios de catéter (4) se diseñan para introducir células endoteliales infectadas en una región discreta de la arteria. El catéter tiene unos medios de globo proximales y distales (2) y (1), respectivamente, (p. ej., cada medio de globo puede tener aproximadamente  $3 \text{ mm}$  de longitud y aproximadamente  $4 \text{ mm}$  de ancho), con una extensión de los medios del catéter entre los globos. La extensión de los medios del catéter entre los globos tiene unos medios de orificio conectados con unos medios de orificio para instilación (3). Cuando los globos proximales y distales están inflados, se crea un espacio central en el vaso, que permite la instilación de las células infectadas a través del orificio.

Una región del vaso sanguíneo se identifica como un punto de referencia anatómico y los medios de globo proximales (2) se inflan para denudar el endotelio por trauma mecánico (p. ej., haciendo pasar a la fuerza un catéter de globo parcialmente inflado dentro del vaso) o por trauma mecánico junto con pequeñas cantidades de una enzima proteolítica tal como dispasa, tripsina, collagenasa, papaína, pepsina, quimi tripsina o cathepsina, o incubando sólo con estas enzimas proteolíticas. Además de las enzimas proteolíticas, se pueden emplear liposomas. La región del vaso sanguíneo también se puede denudar tratando con un detergente suave o similar, tal como NP-40, Triton X100, desoxicolato o SDS.

Las condiciones para denudar se ajustan para conseguir una pérdida esencialmente completa del endotelio para las transferencias de células o aproximadamente de 20 a 90%, preferentemente 50 a 75%, de pérdida de células de la pared del vaso para una infección directa. En algunos casos, no es necesario eliminar las células. A continuación se hace avanzar el catéter de modo que los medios del orificio para la instilación (3) se sitúen en la región del endotelio denudado. Las células infectadas, transfectadas o normales se instilan a continuación en la sección discreta de la arteria, durante treinta minutos. Si el vaso sanguíneo riega un órgano que puede tolerar algo de isquemia, p. ej., el músculo esquelético, la perfusión distal no es un problema grave pero se puede sustituir si es necesario, por una derivación externa o empleando un catéter que permita la perfusión distal. Después de la instilación de las células endoteliales infectadas, el catéter de globo se retira y el sitio de la punción arterial y la incisión local en la piel se curan. Si es necesaria una perfusión distal, se puede utilizar un catéter alternativo diseñado para permitir la perfusión distal.

#### B. Introducción de genes recombinantes directamente en las células sobre la pared de un vaso sanguíneo o perfundidos a través de una circulación específica *in vivo*; infección o transfección de las células de la pared vascular y de los órganos

Se emplean las técnicas quirúrgicas tal y como se ha descrito anteriormente. En lugar de emplear células infectadas, un vector vírico que transduce material genético deseado con un título elevado ( $10^5$  a  $10^6$  partículas/ml) o un ADN que forma un complejo con un vector de entrega, se instila directamente en la pared vascular, empleando la técnica de catéter de doble globo. Este vector se instila en el medio que contiene suero y polibreno ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) para mejorar la eficacia de la infección. Después de incubar en el espacio muerto creado por el catéter, durante un periodo de tiempo adecuado ( $0,2$  a  $2$  horas o superior), este medio se retira, se lava suavemente con solución salina tamponada con fosfato y se restablece la circulación arterial. Protocolos similares se emplean para la recuperación postoperatoria.

La superficie del vaso se puede preparar sólo mediante denudación mecánica junto con pequeñas cantidades de enzimas proteolíticas, tales como dispasa, tripsina, collagenasa o catepsina, o mediante incubación sólo con estas enzimas proteolíticas. Las condiciones de la denudación se ajustan para conseguir la pérdida deseada de las células de la pared vascular.

El vector vírico o el complejo ADN-vector se instila en medio Eagle modificado de Dulbecco, empleando el virus purificado o complejos que contienen suero autólogo, y las moléculas adhesivas, tales como polibreno (10 µg/ml), poli-L-lisina, dextran-sulfato o cualquier sustancia policationica que sea fisiológicamente adecuada, o un anticuerpo híbrido dirigido contra la glicoproteína de la envuelta del virus o del vector y la diana adecuada en la pared del vaso o en el tejido perfundido con el vaso, para mejorar la eficacia de la infección, incrementando la adhesión de las partículas víricas con las células diana adecuadas. El anticuerpo híbrido dirigido contra la glicoproteína de la envuelta del virus o del vector y de la célula diana adecuada, se puede preparar según uno de dos métodos. Los anticuerpos dirigidos contra diferentes epítomos se pueden entrecruzar químicamente (G. Jung, C. J. Honsik, R. A. Reisfeld y H. J. Muller-Eberhard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4479 (1986); U. D. Staerz, O. Kanagawa y M. J. Bevan, *Nature*, 314, 628 (1985); y P. Perez, R. W. Hoffman, J. A. Titus y D. M. Segal, *J. Exp. Med.*, 163, 166 (1986) o se puede emparejar biológicamente empleando hibridomas híbridos (U. D. Staerz y M. J. Bevan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 1453 (1986); y C. Milstein y A. C. Cuello, *Nature*, 305, 537 (1983)). Después de incubar en el espacio central del catéter durante 0,2 a 2 horas o más, se retira el medio, se lava suavemente con solución salina tamponada con fosfato y se restablece la circulación.

Empleando un diseño diferente de catéter (véase la Figura 2), también se puede utilizar un protocolo diferente para la instilación. Este segundo acercamiento implica el uso de unos medios de globo únicos (2) con medios de orificios múltiples (3) que permiten la entrega a alta presión del retrovirus en segmentos arteriales parcialmente denudados. La superficie del vaso se prepara tal y como se ha descrito anteriormente y el vector defectuoso se introduce empleando moléculas de adhesión similares. En este caso, el uso de un sistema de entrega a alta presión sirve para mejorar la interacción de los vectores con las células en el tejido vascular adyacente.

La presente descripción también proporciona el uso de factores de crecimiento entregados localmente con un catéter o de forma sistémica, para mejorar la eficacia de la infección. Además de los vectores retrovíricos, el herpesvirus, el adenovirus u otros vectores víricos son vectores adecuados para la presente técnica.

También es posible transformar células dentro de un órgano o de un tejido. La transformación directa de células de un órgano o tisulares se puede realizar según uno de dos métodos. En el primer método, se emplea una transfección a alta presión. La alta presión causará la migración del vector a través de las paredes vasculares sanguíneas hacia el tejido circundante. En un segundo método, la inyección en un lecho capilar, opcionalmente después de una lesión para permitir la filtración, ocasiona la infección directa de los tejidos circundantes.

El tiempo necesario para la instilación de los vectores o de las células dependerá del aspecto particular que se vaya a emplear de esta descripción. Por tanto, para instilar células o vectores en un vaso sanguíneo, el tiempo adecuado podría ser desde 0,01 hasta 12 horas, preferentemente 0,1 a 6 horas, lo más preferido de 0,2 a 2 horas. Alternativamente, para la instilación de vectores o células a alta presión, se preferirán tiempos más cortos.

#### *Obtención de las células empleadas en esta invención*

La expresión "material genético" se refiere generalmente a ADN que codifica una proteína. Esta expresión también incluye ARN cuando se emplea un virus de ARN u otro vector basado en ARN.

La transformación es el proceso por el cual las células incorporan un gen exógeno mediante infección directa, transfección u otros medios de absorción.

El término "vector" es bien conocido y es sinónimo de la frase empleada frecuentemente, "vehículo de clonación". Un vector es un ADN bicatenario no cromosómico que comprende un replicón intacto, de modo que el vector se replica cuando se coloca en un organismo unicelular, por ejemplo, mediante un proceso de transformación. Los vectores víricos incluyen retrovirus, adenovirus, herpesvirus, papovirus o virus presentes en la naturaleza modificados de otro modo. Vector también significa una formulación de ADN con una sustancia química o una sustancia que permite la absorción en las células.

También se describen en esta memoria métodos para inhibir la expresión de un gen. Se pueden utilizar cuatro acercamientos para conseguir esta meta. Estos incluyen el uso de agentes complementarios, tanto oligonucleótidos sintéticos que son complementarios al ARNm (Maher III, L. J. y Dolnick, B. J. *Arch. Biochem. Biophys.*, 253, 214-220 (1987) y Zamecnik, P.C. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4143-4146 (1986)), o el uso de plásmidos que expresan el complemento inverso de este gen (Izant, J. H. y Weintraub, H., *Science*, 229, 345-352, (1985); *Cell*, 36, 1077-1015 (1984)). Además, los ARNs catalíticos, denominados ribozimas, pueden degradar específicamente las secuencias de ARN (Uhlenbeck, O. C., *Nature*, 328, 596-600 (1987), Haseloff, J. y Gerlach, W. L., *Nature*, 334, 585-591 (1988)). El tercer acercamiento implica la "inmunización intracelular" en donde análogos de las proteínas intracelulares pueden interferir específicamente con su función (Friedman, A. D., Triezenberg, S. J. y McKnight, S. L., *Nature*, 335, 452-454 (1988)), se describe más detalladamente a continuación.

El primer acercamiento se puede utilizar para eliminar específicamente los transcritos en células. La pérdida del transcrito se puede confirmar por el análisis con nucleasa S1 y la expresión de la proteína de la unión determinada, empleando un ensayo funcional. Análogos oligonucleótidos monocatenarios se pueden utilizar para interferir en el procesamiento o en la traducción del ARNm del factor de transcripción. Resumiendo, se pueden preparar oligonucleótidos sintéticos o análogos derivados de tior (20-50 nucleótidos) complementarios a la cadena codificadora del gen diana. Estos agentes complementarios se pueden preparar contra regiones diferentes del ARNm. Son complementarios a la región 5' no traducida, al sitio de inicio de la traducción y a las siguientes 20-50 pares de bases, a la región codificadora central o a la región 3' no traducida del gen. Los agentes complementarios se pueden incubar con las células transfectadas antes de la activación. La eficacia de los competidores complementarios dirigidos hacia diferentes partes del ARN mensajero, se puede comparar para determinar si unas regiones específicas pueden ser más eficaces para evitar la expresión de estos genes.

El ARN puede actuar también de modo autocatalítico para provocar la autólisis o para degradar específicamente las secuencias de ARN complementarias (Uhlenbeck, O. C., *Nature*, 328, 596-600 (1987), Haseloff, J. y Gerlach, W. L., *Nature*, 334, 85-591 (1988), y Hutchins, C. J. y col., *Nucleic Acids Res.*, 14, 3627-3640 (1986)). Los requisitos para una escisión adecuada del ARN, incluyen una estructura de cabeza de martillo con la secuencia de ARN conservada en la región que flanquea esta estructura. Las regiones adyacentes a este dominio catalítico se hacen complementarias a un ARN específico, dirigiendo de este modo la ribozima hacia ARNm celulares específicos. Para inhibir la producción de un gen diana específico, el ARNm que codifica este gen se puede degradar específicamente empleando ribozimas. Resumiendo, cualquier secuencia GUG dentro del transcrito de ARN puede servir como diana para ser degradada por la ribozima. Estas pueden ser identificadas mediante un análisis de la secuencia de ADN y los sitios GUG que abarcan el transcrito de ARN, se pueden utilizar para la degradación específica. Los sitios en la región 5' no traducida, en la región codificadora, y en la región 3' no traducida, pueden ser dianas para determinar si una región es más eficaz en la degradación de este transcrito. Los oligonucleótidos sintéticos que codifican 20 pares de bases de secuencia complementaria, aguas arriba del sitio GUG, la estructura de cabeza de martillo y 20 pares de bases de secuencia complementaria aguas abajo de este sitio, se pueden insertar en el sitio adecuado en el ADNc. De este modo, la ribozima puede servir como diana para el mismo compartimento celular que el mensaje endógeno. Las ribozimas insertadas aguas abajo de potenciadores específicos que proporcionan un alto nivel de expresión en células específicas, también se pueden generar. Estos plásmidos se pueden introducir en células diana adecuadas, empleando la electroporación y la cotransfección con un plásmido resistente a la neomicina, pSV2-Neo, u otro marcador seleccionable. La expresión de estos transcritos se puede confirmar por transferencia de tipo Northern y análisis con la nucleasa S1. Cuando se confirma, se puede evaluar la expresión del ARNm con protección frente a la nucleasa S1, para determinar si la expresión de estos transcritos reduce los niveles de equilibrio dinámico del ARNm diana y los genes que lo regulan. El nivel de proteína también se puede examinar.

Los genes también se pueden inhibir preparando transcritos mutantes que carecen de dominios necesarios para la activación. Brevemente, después de identificar el dominio, se sintetiza una forma mutante que es incapaz de tener una función estimulante. Este producto génico truncado se puede insertar aguas abajo del potenciador de SV-40 en un plásmido que contiene el gen de resistencia a la neomicina (Mulligan, R. y Berg, P., *Science*, 209, 1422-1427 (1980) (en una unidad de transcripción separada). Este plásmido se puede introducir en las células y se puede seleccionar empleando G418. La presencia de la forma mutante de este gen se confirmará con el análisis con la nucleasa S1 y por inmunoprecipitación. La función de la proteína endógena en estas células se puede evaluar de dos maneras. Primera, la expresión del gen normal se puede examinar. Segunda, la función conocida de estas proteínas se puede evaluar. En el caso de que esta forma mutante intercelular obstaculizante sea tóxica para su célula hospedadora, se puede introducir en un elemento de control inducible, tal como el promotor de la metalotioneína. Después de aislar líneas celulares estables, las células se pueden incubar con Zn o Cd para expresar este gen. Su efecto sobre las células hospedadoras se puede evaluar a continuación.

Otro acercamiento a la inactivación de genes específicos, es hiperexpresar proteínas recombinantes que antagonizan la expresión o la función de otras actividades. Por ejemplo, si se desea disminuir la expresión de tPA (p. ej., en un tratamiento clínico de la trombolisis diseminada), se podría hiperexpresar el inhibidor del activador del plasminógeno.

Los avances de los últimos años en bioquímica y en biología molecular, han conducido a la construcción de vectores "recombinantes" en los que, por ejemplo, se construyen retrovirus y plásmidos que contienen ARN o ADN exógeno, respectivamente. En casos particulares, el vector recombinante puede incluir ARN o ADN heterólogo, entendiendo ARN o ADN que codifica un polipéptido que normalmente no es producido por el organismo susceptible de transformación con el vector recombinante. La producción de vectores de ARN y ADN recombinantes es bien conocida y no es necesario describirla detalladamente. Sin embargo, en esta memoria se incluye una breve descripción de este proceso a modo de referencia.

Por ejemplo, un retrovirus o un vector plasmídico se puede escindir para proporcionar ARN o ADN lineal que tenga extremos ligables. Estos extremos se unen a ARN o ADN exógeno que tiene extremos ligables preferentemente complementarios, para proporcionar una molécula de ARN o ADN recombinante y biológicamente funcional que tenga un replicón intacto y una propiedad fenotípica deseada.

Están disponibles una variedad de técnicas para la recombinación de ARN y de ADN, en las que los extremos contiguos de fragmentos separados de ARN o de ADN se adaptan para facilitar la ligación.

El ARN o ADN exógeno, es decir donante, empleado en los métodos descritos en esta memoria, se obtiene a partir de células adecuadas. El vector se construye empleando técnicas conocidas para obtener una célula transformada capaz de expresar *in vivo* la proteína del agente terapéutico. La célula transformada se obtiene poniendo en contacto una célula diana con una formulación que contiene ARN o ADN, que permite transferir y absorber el ARN o el ADN en la célula diana. Tales formulaciones incluyen, por ejemplo, retrovirus, plásmidos, formulaciones liposómicas o complejos de plásmidos con sustancias policatiónicas, tales como poli-L-lisina, DEAE-dextrano y ligandos que se dirigen a la diana.

La presente descripción proporciona de este modo la alteración genética de células como un método para transmitir agentes terapéuticos o de diagnóstico a regiones localizadas de los vasos sanguíneos, para fines locales o sistémicos. El intervalo de proteínas recombinantes que se pueden expresar en estas células es amplio y variado. Incluye la transferencia de genes empleando vectores que expresan tales proteínas, como tPA para el tratamiento de la trombosis y la restenosis, la angiogénesis o factores de crecimiento para fines de revascularización y factores vasoactivos para aliviar la vasoconstricción o el vasoespasmo. Esta técnica también se puede extender al tratamiento genético de enfermedades hereditarias o de enfermedades adquiridas, localizadas o sistémicas. Los métodos descritos en esta memoria también se pueden utilizar para introducir células normales en sitios específicos de pérdida celular, por ejemplo, para sustituir un endotelio dañado durante la angioplastia o la cateterización.

Por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades isquémicas (enfermedades trombóticas), el material genético que codifica tPA o modificaciones de la misma, uroquinasa o estreptoquinasa, se emplea para transformar las células. En el tratamiento de la insuficiencia isquémica de un órgano (p. ej., corazón, riñón, intestino, hígado, etc.) se puede utilizar el material genético que codifica agentes de recolonización, tales como el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), la angionenina, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , el factor de necrosis tumoral  $\beta$ , el factor ácido de crecimiento de fibroblastos o el factor básico de crecimiento de fibroblastos. En el tratamiento de enfermedades vasomotoras, se puede emplear material genético que codifica agentes vasodilatadores o vasoconstrictores. Estos incluyen el factor atrial natriurético, el factor de crecimiento derivado de plaquetas o la endotelina. En el tratamiento de la diabetes, se puede utilizar material genético que codifica insulina.

Los métodos descritos en esta memoria también se pueden utilizar en el tratamiento de cánceres, situando las células transformadas en la proximidad del cáncer. En esta aplicación, se puede emplear el material genético que codifica la toxina diftérica, la toxina pertussis o la toxina colérica.

En un aspecto, la presente descripción proporciona la terapia del cáncer, estimulando una respuesta inmune contra las células tumorales o inhibiendo el crecimiento de las células tumorales o la metástasis por modificación genética *in vivo*. Este acercamiento difiere de métodos previos en los que las células tumorales se propagaban, modificaban y seleccionaban *in vitro*.

De acuerdo con este aspecto, una secuencia de ADN o una secuencia de ARN, que incluye genes recombinantes, se entrega a las células tumorales *in vivo* con (1) vectores retrovíricos o víricos como vehículos, (2) complejos de ADN o ARN/liposoma como vehículos, (3) formulaciones químicas que contienen la secuencia de ADN o de ARN y están acopladas a una molécula vehículo que facilita la entrega de la secuencia a las células que son diana, o (4) empleando la transferencia de genes mediada con células, para entregar los genes a sitios específicos *in vivo*, p. ej., dependiendo del uso de células del músculo liso vasculares o de células endoteliales que se han transducido *in vitro* como un vehículo para entregar el gen recombinante en el sitio del tumor.

En este contexto, el objeto de la presente invención, tal y como se define en las reivindicaciones anejas, es el uso de una secuencia de ADN o de ARN y de un vehículo para la secuencia seleccionada, entre el grupo consistente en vectores víricos que facilitan la entrega *in vivo* de la secuencia a las células tumorales, para la fabricación de un medicamento para tratar un tumor en un mamífero mediante inyección directa del medicamento en el tumor o el sitio del tumor, de modo que las células del tumor se transformen, en donde la secuencia de ADN o de ARN es un miembro seleccionado entre el grupo consistente en secuencias de ADN o ARN que codifican agentes estimulantes/inhibidores del sistema inmune y del crecimiento, que incluyen agentes inductores de la diferenciación, tales como agentes estimulantes que incluyen la interleucina-2, la interleucina-3, la interleucina-4, la interleucina-6, agentes inductores/inhibidores de la diferenciación, tales como TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, interleucina-1 e interferones.

En un aspecto de esta realización, la presente invención depende del sistema inmune para proporcionar una protección contra el cáncer y tiene un papel importante como tratamiento complementario de un cáncer. La inmunoterapia parece que promete como acercamiento complementario al tratamiento de los cánceres. Los linfocitos T citolíticos y las linfocinas pueden facilitar la destrucción de células tumorales y las estrategias para potenciar la regresión tumoral mediante la administración de citocinas o linfocitos que se infiltran en el tumor, han mostrado una eficacia en modelos animales y en ensayos en seres humanos. Por ejemplo, se conoce que los linfocitos agresores activados con linfocinas (LAK) y los linfocitos que se infiltran en el tumor (TIL) pueden lisar células neoplásicas y producir un rechazo total o parcial del tumor. La expresión de los genes de la citocina en células tumorales, también ha potenciado la regresión del tumor.

La presente invención proporciona un nuevo acercamiento a la transferencia génica contra tumores, mediante la introducción de genes recombinantes directamente en las células tumorales *in vivo*, en contraposición con las técnicas

tradicionales de transferencia génica que se han orientado hacia la modificación de células tumorales *in vitro* seguido de transferencia de las células modificadas. Los acercamientos de la técnica anterior no son ventajosos porque someten las células a una selección en condiciones de crecimiento diferentes a las que tienen *in vivo* y porque también se requiere que las líneas celulares se establezcan para cada cáncer, volviendo de este modo considerablemente más difícil la adaptabilidad a la enfermedad humana.

Los genes que se pueden utilizar para la modificación de células tumorales *in vivo* incluyen genes que contienen una secuencia de ADN (o se puede utilizar la secuencia de ARN correspondiente) que codifica una molécula intracelular, secretada o de la superficie celular que es exógena para el paciente y que (1) es inmunógena para el paciente, (2) que induce el rechazo del tumor, la regresión o ambos, o (3) que es tóxica para las células del tumor.

Sin embargo, en el contexto de la presente invención, la secuencia de ADN o de ARN es un miembro seleccionado entre el grupo consistente en secuencias de ADN o de ARN que codifican agentes estimulantes/inhibidores del sistema inmune y del crecimiento, que incluyen agentes inductores de la diferenciación, tales como los agentes estimulantes que incluyen la interleucina-2, la interleucina-3, la interleucina-4, la interleucina-6, agentes inhibidores/inductores de la diferenciación, tales como TFG- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, interleucina-1 e interferones.

Los vectores que contienen la secuencia de ADN (o la secuencia de ARN correspondiente) que se pueden utilizar de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, pueden ser un vector de expresión eucariótica que contiene la secuencia de ADN o de ARN de interés. Las técnicas para obtener la expresión de las secuencias de ADN o de ARN exógenas en un hospedador son conocidas. Véase, por ejemplo, Korman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1987) 84:2150-2154.

Este vector, tal y como se ha indicado anteriormente, se puede administrar al paciente con un vehículo de vector retroviral u otro vector vírico (es decir, un vector vírico), un complejo de ADN o ARN/liposoma o empleando la transferencia génica mediada por células. Además, el vector, cuando está presente en forma no vírica, se puede administrar como una formulación química que contiene una secuencia de ADN o ARN acoplada a una molécula vehículo que facilita la entrega a la célula hospedadora. Dicha molécula vehículo podría incluir un anticuerpo específico de las células a las que se está entregando el vector o una molécula capaz de interactuar con un receptor asociado con las células diana.

La transferencia génica mediada por células se puede utilizar de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria. De este modo, depende de la entrega de genes recombinantes en organismos vivos mediante la transferencia del material genético a células obtenidas a partir del hospedador y la modificación en cultivo celular, seguido de la introducción de las células alteradas genéticamente en el hospedador. Una línea celular ilustrativa de empaquetamiento que se puede emplear de acuerdo con esta realización, está descrita por Danos y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85:6460.

La secuencia de ADN o de ARN que codifica la molécula empleada de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, se puede administrar al paciente que puede ser humano o un animal, de forma local o sistémica. La administración sistémica se realiza preferentemente empleando la formulación química de ADN o ARN no vírica, acoplada a una molécula vehículo que facilita la entrega a las células hospedadoras. Cualquiera de las administraciones se puede realizar con una inyección por vía IV o IM o con inyección por vía subcutánea, empleando cualquier medio conocido o empleando un catéter, tal y como se describe en esta memoria.

Los vehículos de vectores retrovirales empleados de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria, comprenden una partícula vírica obtenida a partir de un retrovirus presente en la naturaleza, que se ha alterado genéticamente para que tenga una replicación defectuosa y para expresar un gen recombinante de interés. Una vez que el virus entrega su material genético a una célula, no genera virus infecciosos adicionales, sino que introduce genes recombinantes exógenos en la célula.

En otros vectores víricos, la partícula vírica empleada se obtiene a partir de otros virus presentes en la naturaleza que se han alterado genéticamente para que su replicación sea defectuosa y para expresar genes recombinantes. Tales vectores víricos se pueden obtener a partir de adenovirus, papilomavirus, herpesvirus, parvovirus, etc.

Las secuencias también se pueden administrar como un complejo de ADN o ARN/liposoma. Tales complejos comprenden una mezcla de partículas de grasa, lípidos que se unen a material genético, ADN o ARN, proporcionando un revestimiento hidrófobo que permite que el material genético se entregue a las células. Esta formulación proporciona un vector no vírico para la transferencia génica. Los liposomas empleados de acuerdo con la invención pueden comprender DOPE (dioleil-fosfatidil-etanolamina), CUDMEDA (N-(5-colesterol- $\beta$ -ol 3-uretil)-N',N'-dimetiletilen diamina).

Tal y como se ha indicado anteriormente, otros vectores no víricos también se pueden emplear de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria. Estos incluyen formulaciones químicas de ADN o ARN acopladas a una molécula vehículo (p. ej., un anticuerpo o un ligando del receptor) que facilitan la entrega a las células hospedadoras, con el fin de alterar las propiedades biológicas de las células hospedadoras. La expresión "formulaciones químicas" empleada en esta memoria, se refiere a modificaciones de ácidos nucleicos para permitir el acoplamiento de los compuestos de ácido nucleico con una molécula vehículo proteica o lipídica, o un derivado de las mismos. Tales moléculas vehículo

incluyen anticuerpos específicos de las células hospedadoras o de los ligandos del receptor, es decir, moléculas capaces de interactuar con los receptores asociados con las células hospedadoras.

En el contexto de la presente invención, sin embargo, se emplean vectores víricos.

Las moléculas que se pueden utilizar de acuerdo con los métodos descritos en esta memoria incluyen las siguientes: (1) genes que codifican agentes estimulantes del sistema inmune, tales como los genes de la clase I del complejo de histocompatibilidad, genes bacterianos que incluyen genes de micobacterias (PPD) y genes que codifican proteínas de choque térmico, genes que codifican glicoproteínas víricas que incluyen la proteína G del virus de la estomatitis vesicular, la hemoaglutinina de la gripe y la glicoproteína  $\beta$  del herpesvirus, antígenos del complejo menor de histocompatibilidad, proteínas ajenas, tales como lisozima o seroalbúmina bovina y oncogenes, que incluyen KIA, P53 (mutantes) y tax; (2) agentes estimulantes/inhibidores del sistema inmune y del crecimiento que incluyen agentes inductores de la diferenciación, tales como agentes estimulantes que incluyen la interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-3, IL-6 o IL-8, agentes inhibidores/inductores de la diferenciación, tales como TNF- $\alpha$  o  $\beta$ , TGF- $\beta$  (1, 2 o 3), IL-1, receptores solubles del factor de crecimiento (receptores de PDGF, FGF), anticuerpos recombinantes para factores de crecimiento o receptores, análogos de factores de crecimiento (PDGF, FGF), interferones ( $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ ) y moléculas de adhesión; o (3) toxinas o marcadores seleccionables negativos que incluyen la quinasa de timidina, la toxina diftérica, la toxina pertussis o proteínas sensibles a fármacos.

Tal y como se ha indicado en otro lugar en esta memoria, la secuencia de ADN y de ARN que se emplea de acuerdo con la presente invención, es un miembro seleccionado entre el grupo consistente en secuencias de ADN o de ARN que codifican agentes estimulantes/inhibidores del sistema inmune y del crecimiento que incluyen agentes inductores de la diferenciación, tales como agentes estimulantes que incluyen interleucina-2, interleucina-3, interleucina-4, interleucina-6, agentes inhibidores/inductores de la diferenciación tales como TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, interleucina-1 e interferones.

La secuencia de ADN/ARN se obtiene preferentemente a partir de una fuente de la misma especie que el paciente, pero esto no es absolutamente necesario y la presente invención proporciona el uso de secuencias de ADN obtenidas a partir de una fuente de una especie diferente a la del paciente, de acuerdo con esta realización. En el método descrito en esta memoria, los genes que codifican los agentes estimulantes del sistema inmune y las toxinas o los marcadores negativos seleccionables, que se corresponden con (1) y (3) anteriores, se seleccionan preferentemente a partir de una especie diferente a la especie a la que pertenece el paciente. Para los agentes estimulantes/inhibidores del sistema inmune y del crecimiento, que se corresponden con (2) anterior, se emplea preferentemente un gen obtenido a partir de una especie que es la misma que la especie del paciente.

En el uso de los métodos descritos en esta memoria en el tratamiento del SIDA, se puede utilizar el material genético que codifica CD4 soluble o sus derivados. En el tratamiento de enfermedades genéticas, por ejemplo, una deficiencia de la hormona de crecimiento, se emplea el material genético que codifica la sustancia necesaria, por ejemplo, la hormona de crecimiento humana. Todos estos materiales genéticos están fácilmente a disposición para un experto en la técnica.

También se describe en esta memoria un equipo de reactivos para tratar una enfermedad en un paciente que contiene un catéter y una solución que contiene una enzima o un detergente suave, en donde el catéter se adapta para la inserción en un vaso sanguíneo y contiene un cuerpo principal del catéter que tiene un elemento de globo, adaptado para ser insertado en dicho vaso y es expansible contra las paredes del vaso sanguíneo, de modo que sostiene el cuerpo del catéter principal en su lugar en el vaso sanguíneo, y unos medios transportados por el cuerpo del catéter principal para entregar una solución en el vaso sanguíneo y la solución que contiene la enzima o el detergente suave es una solución fisiológicamente aceptable. La solución puede contener una enzima proteolítica, tal como tripsina, tripsina, colagenasa, papaína, pepsina o quimiotripsina. Además de las enzimas proteolíticas, se pueden utilizar liposomas. Como detergente suave, la solución puede contener NP-40, Triton X-100, desoxicolato, SDS o similares.

Alternativamente, el equipo de reactivos puede contener una solución fisiológicamente aceptable que contiene un agente tal como heparina, poli-L-lisina, polibreno, dextran-sulfato, un material policatiónico o anticuerpos bivalentes. Esta solución también puede contener vectores o células (normales o transformadas). El equipo puede contener un catéter y una solución que contiene una enzima o un detergente suave y una solución que contiene un agente tal como heparina, poli-L-lisina, polibreno, dextran-sulfato, un material policatiónico o un anticuerpo bivalente y que puede contener opcionalmente vectores o células.

El equipo contiene un catéter con un único globo y un orificio central distal para la perfusión, junto con soluciones aceptables para permitir la introducción de las células en un órgano específico o de vectores en un lecho capilar o células en un órgano o tejido específico, perfundido con este lecho capilar.

Alternativamente, el equipo puede contener un cuerpo principal del catéter que tiene dos elementos de globo separados que están adaptados para insertarse en el vaso sanguíneo, pudiéndose expandir ambos contra las paredes del vaso sanguíneo para proporcionar una cámara en el vaso sanguíneo y sostener el catéter principal en su posición. En este caso, los medios para entregar una solución en la cámara, se sitúan entre los elementos de globo. El equipo puede contener un catéter que posee una pluralidad de medios de orificio para aportar la solución al vaso sanguíneo.

Por tanto, la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad en un paciente, haciendo que una fijación de células sobre las paredes de un vaso o las células de un órgano perfundido por este vaso en el paciente, exprese una proteína de un agente terapéutico exógeno, en donde la proteína trata la enfermedad o puede ser útil para fines de diagnóstico. El método se puede utilizar para tratar enfermedades, tales como una enfermedad isquémica, una enfermedad vasomotora, la diabetes, un cáncer, el SIDA o una enfermedad genética.

El método puede emplear proteínas de un agente terapéutico exógeno, tales como tPA o modificaciones de la misma, uroquinasa, estreptoquinasa, factor ácido de crecimiento de fibroblastos, factor básico de crecimiento de fibroblastos, factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , factor de necrosis tumoral  $\beta$ , factor de crecimiento transformante  $\alpha$ , factor de crecimiento transformante  $\beta$ , factor natriurético atrial, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, endotelina, insulina, toxina diftérica, toxina pertussis, toxina colérica, CD4 soluble y sus derivados, y hormona de crecimiento para tratar enfermedades.

El método puede emplear también proteínas exógenas con valor diagnóstico. Por ejemplo, una proteína marcadora, tal como  $\beta$ -galactosidasa se puede utilizar para vigilar la migración celular.

Se prefiere que las células que van a expresar la proteína del agente terapéutico exógeno, sean células endoteliales.

Otras características de los métodos descritos en esta memoria serán evidentes en el curso de las siguientes descripciones que se proporcionan a modo de ilustración.

Los datos descritos a continuación muestran la viabilidad de la transferencia de células endoteliales y de trasplante de genes; estas células endoteliales se pueden implantar de forma estable *in situ* sobre la pared arterial mediante cateterización y expresan una proteína recombinante marcadora,  $\beta$ -galactosidasa, *in vivo*.

Ya que la aterogénesis en los cerdos tiene similitudes con la de humanos, se escogió una cepa endogámica de cerdo, el "minicerdo Yucatán" (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA) como modelo animal (1). Se estableció una línea principal de células endoteliales a partir de la vena yugular interna de un minicerdo hembra, de 8 meses de edad. La identidad de las células endoteliales de esta línea se confirmó porque las células mostraban características del crecimiento y morfología típica del endotelio porcino en cultivo de tejidos. Las células endoteliales también expresan receptores para la forma acetilada de la lipoproteína de baja densidad (AcLDL), en contraposición con los fibroblastos y otras células del mesénquima (2). Cuando se analiza la expresión del receptor AcLDL, más del 99% de las células cultivadas contenían este receptor, tal y como se estudió mediante la absorción de ACLDL fluorescente.

Dos líneas endoteliales independientes que expresaban  $\beta$ -galactosidasa, se aislaron después de la infección con un vector retroviral anfótropo de múrido que transducía  $\beta$ -galactosidasa, (BAG) que es defectuoso para la replicación y que contiene los genes de resistencia a la  $\beta$ -galactosidasa y a la neomicina (3). Las células que contienen este vector se seleccionaron por su capacidad para crecer en presencia de G-418. Más del 90% de las células seleccionadas sintetizaban  $\beta$ -galactosidasa mediante tinción histoquímica. La naturaleza endotelial de estas células modificadas genéticamente, también se confirmó por análisis de absorción de ACLDL fluorescente. La infección con retrovirus BAG se verificó adicionalmente con análisis de transferencia de tipo Southern que reveló la presencia de ADN provírico intacto, en aproximadamente una copia por genoma.

Las células endoteliales obtenidas a partir de esta cepa endogámica, que era singénica, se podían aplicar para estudiar más de un minicerdo y se sometieron a ensayo en nueve individuos experimentalmente diferentes. Bajo anestesia general, se descubrieron las arterias femoral e ilíaca y se introdujo un catéter en el vaso (Figura 1). Los tejidos de la capa íntima de la pared arterial se desnudaron mecánicamente, haciendo pasar a la fuerza dentro del vaso un catéter de globo parcialmente inflado. La arteria se lavó con solución salina heparinizada y se incubó con proteasa neutra, dispasa (50 U/ml), la cual eliminó cualquier resto de células endoteliales en el lumen. La enzima residual se inactivó fácilmente con globulina  $\alpha 2$  en el plasma después de deshinchar los globos del catéter y permitiendo que la sangre circulara a través del segmento del vaso. Las células endoteliales cultivadas que expresaban la  $\beta$ -galactosidasa se introdujeron empleando un catéter arterial diseñado especialmente (USCI, Billerica, MA) que contenía dos globos y un orificio central para instilación (Figura 1).

Cuando estos globos se inflaron, se creó un espacio protegido dentro de la arteria en el cual se instilaron las células a través del orificio central 3 (Figura 1). Estas células endoteliales, que expresaban la  $\beta$ -galactosidasa, se cultivaron durante 30 minutos para facilitar su fijación al vaso desnudado. A continuación, se retiró el catéter, se ligó el brazo de la arteria y se cerró la incisión.

Los segmentos de la arteria que habían sido inoculados con el endotelio que expresaba  $\beta$ -galactosidasa, se retiraron 2 a 4 semanas después. El examen a groso modo del espécimen de la arteria después de la tinción empleando cromógeno X-gal, mostraba múltiples áreas de coloración azul, comparado con una arteria inoculada con endotelio sin infectar, indicando una actividad  $\beta$ -galactosidasa. La microscopía óptica documentaba una tinción de la  $\beta$ -galactosidasa principalmente en las células endoteliales de la capa íntima en los vasos inoculados experimentalmente.

Por el contrario, no se observó ninguna evidencia de una tinción similar en los segmentos testigos, que habían recibido células endoteliales que no contenían  $\beta$ -galactosidasa. La tinción de la  $\beta$ -galactosidasa era ocasionalmente evidente en tejidos más profundos de la capa íntima, sugiriendo una compresión o una migración del endotelio inocu-

lado dentro de la pared del vaso previamente dañado. Se observó una trombosis local en los dos primeros individuos. Esta complicación se redujo en estudios posteriores, administrando ácido acetilsalicílico antes del proceso de transferencia de las células endoteliales y antes de usar la anticoagulación con heparina en el momento de la inoculación. En el caso de formación de trombos, la tinción con  $\beta$ -galactosidasa se observó en células endoteliales que se extendían desde la pared del vaso hasta la superficie del trombo.

Un cuidado principal que hay que tener en el trasplante de genes *in vivo* está relacionado con la producción de retrovirus competentes para la replicación, procedentes de células modificadas genéticamente. En estos ensayos el problema potencial se ha reducido con el uso de un retrovirus defectuoso para la replicación. No se detectaron virus auxiliares entre estas líneas después de 20 pases *in vitro*. Aunque se emplearon virus defectuosos, debido a su alta tasa de infectividad y a su integración estable en el genoma de la célula hospedadora (4), este acercamiento para la transferencia de genes se puede adaptar a otros vectores víricos.

Un segundo cuidado que hay que observar, implica la duración de la expresión de los genes recombinantes *in vivo*. La expresión de las células endoteliales de la  $\beta$ -galactosidasa parece constante en los vasos examinados seis semanas después de la introducción en el vaso sanguíneo en el presente estudio.

Estos ensayos han mostrado que las células endoteliales modificadas genéticamente se pueden introducir en la pared vascular del minicerdo Yucatán, mediante cateterización de la arteria. Por tanto, el presente método se puede emplear para el tratamiento bioquímico localizado de una enfermedad vascular, empleando como vector un endotelio alterado genéticamente.

Una complicación principal de las intervenciones quirúrgicas actuales relacionadas con la enfermedad vascular, tales como la angioplastia de globo o la inserción de un injerto en un vaso enfermo, es la rotura de la placa aterosclerótica y la formación de trombos en los sitios de trauma local tisular (5). En parte, esto está mediado por una lesión de las células endoteliales (6). Los datos presentes muestran que las células endoteliales genéticamente modificadas se pueden introducir en el momento de la intervención, para reducir la trombosis local.

Esta técnica también se puede emplear en otros tratamientos isquémicos que incluyen la angina inestable o el infarto de miocardio. Por ejemplo, los efectos antitrombóticos se pueden conseguir introduciendo células que expresan genes del activador del plasminógeno tisular o de la uroquinasa. Esta tecnología también es útil para el tratamiento de la isquemia crónica tisular. Por ejemplo, la elaboración de factores angiogénicos o de crecimiento (7) para estimular la formación de vasos colaterales para estimular tejidos con isquemia grave, tal como el miocardio. Finalmente, la sustitución de genes somáticos en enfermedades sistémicas hereditarias, es posible empleando modificaciones de esta técnica de transferencia de genes de células endoteliales.

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a un método para modular el sistema inmune de un animal mediante la transformación *in vivo* de células del animal con un gen recombinante. La transformación se puede realizar de forma no específica del sitio o sistémica o de forma específica del sitio. Si la transformación se realiza de forma sistémica o en sitios distintos de los que confieren la especificidad sobre el sistema inmune, tales como el timo, entonces el sistema inmune se modulará para dar como resultado que el animal esté sensibilizado contra la molécula que es codificada por el gen recombinante. Alternativamente, si la transformación se realiza de forma específica del sitio y está localizada en un sitio que determina la especificidad del sistema inmune, p. ej., el timo, el sistema inmune se modulará para dar como resultado que el animal sea tolerante frente a la molécula codificada por el gen recombinante.

El término sensibilizado significa que el sistema inmune muestra una respuesta más fuerte hacia la molécula codificada por el ADN después de la transformación *in vivo*, que al comparar con la respuesta antes de la transformación. El término tolerante significa que el sistema inmune muestra una respuesta menos fuerte hacia la molécula codificada por el gen recombinante, después de la transformación, comparada con la respuesta antes de la transformación. Por tanto, se puede modular el sistema inmune para proporcionar una resistencia o una tolerancia hacia la molécula codificada por el ADN.

Ejemplos de moléculas hacia las que sería deseable proporcionar una resistencia, incluyen: moléculas de la superficie celular, tales como antígenos tumorales (antígeno carcinoembrionario), antígenos protozoarios (*Pneumocystis*), antígenos víricos (gp120 y gp160 del VIH, el antígeno de *H. influenza* y el antígeno de superficie de la hepatitis B), el antígeno de la enfermedad de Lyme, antígenos bacterianos y antígenos de trasplante (clase I o clase II), oncogenes ras u otros oncogenes que incluyen erb-A o neu; proteínas citoplásmicas, tales como el oncogen raf, el oncogen src y el oncogen abl; proteínas nucleares, tales como el oncogen E1A, el oncogen mutante p53, tat, tax, rev, vpu, vpx, el antígeno del núcleo del virus de la hepatitis, EBNA y genes víricos; y proteínas secretadas, tales como endotoxina, toxina colérica, TNF y el factor activador de osteoclastos.

Ejemplos de moléculas para las que puede ser deseable proporcionar una resistencia, incluyen: moléculas de la superficie celular, tales como los receptores del factor de crecimiento, los receptores de la insulina, los receptores de la hormona tiroidea, los antígenos de trasplante (clase I o clase II), los antígenos de grupos sanguíneos y el receptor de LDL; proteínas citoplásmicas, tales como el citocromo P450, la galactosil-transferasa, la distrofina, el gen de resistencia a la neomicina y la proteína bacteriana de choque térmico; proteínas nucleares, tales como el retinoblastoma y el rev transdominante; y proteínas secretadas, tales como la hormona de crecimiento para enanos, la insulina para diabéticos y la desaminasa de adenosina.

Se entiende que el ácido nucleico, el ADN, el ARN o sus derivados, en el gen recombinante pueden tener cualquier origen adecuado. Es decir, el ácido nucleico se puede aislar a partir de cualquier fuente presente en la naturaleza o puede ser de origen sintético.

5 El gen recombinante se puede introducir en las células del animal empleando cualquier vector convencional. Tales vectores incluyen vectores víricos, lípidos catiónicos que forman complejo con el ADN o con el ARN (ADN o ARN/liposomas) y complejos de ADN o de ARN con policones, tales como DEAE, dextrano y polibreno.

10 Tal y como se ha indicado anteriormente, el gen recombinante se puede introducir en las células de una forma específica del sitio para conferir resistencia a la molécula codificada por el gen recombinante. Los sitios adecuados incluyen, p. ej., las células endoteliales o las células reticuloendoteliales en la vasculatura o en cualquier tejido u órgano específico. La forma de la preparación que contiene el vector y el gen recombinante, empleada en la transformación dependerá del tejido específico que se va a transformar. Las preparaciones adecuadas para transformar células endo-  
15 teliales se describen en otro lugar en esta memoria descriptiva. Además, se pueden utilizar preparaciones adecuadas para administración oral o para otros medios de administración (p. ej., endoscópica) para proporcionar una resistencia a la mucosa. Dicha preparación podría incluir detergentes, gelatinas, cápsulas u otros vehículos de entrega además del vector y del gen para proteger contra la degradación y mejorar la entrega a la superficie mucosa.

20 Alternativamente, el gen recombinante se puede introducir de forma específica del sitio, en un sitio que determina la especificidad del sistema inmune. El timo es uno de esos sitios (véase: A. M. Posselt y col., Science, vol. 249, pág. 1292 (1990)). Por tanto, introduciendo un gen recombinante de forma específica del sitio en el timo, el sistema inmune se puede modular para dar como resultado una tolerancia a la molécula codificada por el gen. De este modo, se puede evitar el rechazo de trasplantes. Las mismas preparaciones y técnicas empleadas para transformar de forma específica del sitio los tumores descritos anteriormente, se pueden usar para introducir el gen recombinante en el timo.  
25 Específicamente, la preparación para la transformación se puede inyectar directamente en el timo o el tumor o en los vasos que riegan el timo o el tumor.

El presente método se puede poner en práctica en cualquier animal, tal como pollos o mamíferos tales como vacas, caballos, gatos, perros, monos, lemures o seres humanos.

30 Cuando se introduce el gen recombinante empleando un liposoma, se prefiere determinar en primer lugar *in vitro*, los valores óptimos para el ADN: las tasas de lípidos y las concentraciones absolutas de ADN y de lípido como una función de la muerte celular y la eficacia de la transformación para el tipo particular de célula que se va a transformar y el uso de estos valores en la transformación *in vivo*. La determinación *in vitro* de estos valores se puede realizar  
35 fácilmente empleando las técnicas descritas en la Sección Experimental de esta memoria descriptiva.

Otro aspecto de la presente descripción se refiere a un equipo de reactivos para la introducción sistémica *in vivo* de un gen recombinante en las células de un animal. Dicho equipo de reactivos incluirá aproximadamente la cantidad óptima de un vehículo, tal como un lípido, y el ácido nucleico, y/o los medios de entrega, p. ej., un endoscopio o una jeringuilla. El equipo de reactivos también puede contener instrucciones para la administración de la preparación transformante. El vehículo y el ácido nucleico se pueden congelar en seco y empaquetar de forma separada o premez-  
40 clada. El equipo de reactivos también puede contener una solución para reconstituir perfectamente los complejos del vehículo y el ácido nucleico, los cuales proporcionan una entrega eficaz a las células *in vivo*. Una solución tal puede contener uno o varios ingredientes, tales como tampones, azúcares, sales, proteínas y detergentes.

45 Habiendo descrito de forma general los métodos especificados en esta memoria, se pueden comprender adicionalmente haciendo referencia a ciertos ejemplos específicos que se proporcionan en esta memoria, sólo con fines ilustrativos y que no pretenden limitar a no ser que se indique de otro modo.

## 50 Sección experimental

### A. Análisis de la expresión del receptor AcLDL en células endoteliales porcinas normales y transducidas con $\beta$ -galactosidasa

55 Se analizaron los cultivos celulares endoteliales obtenidos a partir del minicerdo Yucatán, dos sublíneas infectadas con el retrovirus BAG o con fibroblastos 3T3 testigos, en busca de expresión del receptor de AcLDL empleando AcLDL marcada con fluorescencia.

Las células endoteliales se obtuvieron a partir de las venas yugulares externas, empleando la proteasa neutra dispasa  
60 (8). Los segmentos de vena escindidos se rellenaron con dispasa (50 U/ml en solución salina equilibrada de Hank) y se incubaron a 30°C durante 20 minutos. El endotelio obtenido de este modo se mantuvo en medio 199 (GIBCO, Grand Island, N.Y.) suplementado con suero de ternera fetal (10%), 50  $\mu$ g/ml de suplemento de factor de crecimiento de células endoteliales (ECGS) y heparina (100  $\mu$ g/ml). Estas células se infectaron con retrovirus BAG y se seleccionaron por su resistencia a G-418. Los cultivos celulares se incubaron con AcLDL (perclorato de 1,1'-diocadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina) (DiI) (Biomedical Technologies, Stoughton, MA) (10  $\mu$ g/ml) durante 4-6 horas, a 37°C,  
65 seguido de tres aclarados con solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,5% de glutaraldehído. Las células se visualizaron por microscopía en contraste de fase y fluorescente.

### B. Método para introducir células endoteliales mediante cateterización

Se empleó un catéter de doble globo para la instilación de las células endoteliales. El catéter tiene un globo proximal y distal, cada uno de 6 mm de longitud y 5 mm de ancho, con 20 mm de longitud entre los globos. La sección central del catéter tiene un poro de 2 mm conectado a un orificio de instilación. El hinchado del globo proximal y distal aísla un espacio central, permitiendo la instilación de las células infectadas a través del orificio en un segmento discreto del vaso. Para una representación esquemática de la introducción de las células a través del catéter, véanse las Figuras 1 y 2.

El cuidado de los animales se realizó según los “Principios para el cuidado de animales de laboratorio” y la “Guía para el cuidado y el uso de animales de laboratorio” (NIH, publicación n° 80-23, revisado 1978). Minicerdos Yucatán hembras (80-100 kg) se anestesiaron con pentobarbital (20 mg/kg), se entubaron con ventilación mecánica. Las arterias iliaca y femoral de estos individuos se expusieron quirúrgicamente de forma estéril. La arteria femoral distal se punzó y el catéter de doble globo se hizo avanzar con la guía, en la arteria iliaca. Cuando la arteria iliaca externa se identificó, el globo proximal se infló parcialmente y se hicieron pases proximales y distales de modo que el endotelio se desnudara mecánicamente. El catéter se colocó posteriormente en el espacio central, localizado en la región del endotelio desnudado, y se inflaron ambos globos. El segmento desnudado se irrigó con solución salina heparinizada y las células adherentes residuales se retiraron por instilación de dispasa (20 U/ml) durante 10 min. El vaso desnudado se irrigó adicionalmente con una solución de heparina y las células endoteliales infectadas con BAG se instilaron durante 30 minutos. El catéter de globo se retiró posteriormente y se restauró el flujo sanguíneo anterógrado. Los segmentos del vaso se escindieron 2 a 4 semanas después. Una porción de la arteria se colocó en glutaraldehído al 0,5% durante cinco minutos y se almacenó en solución salina tamponada con fosfato y otra porción se montó en un bloque de parafina para seccionarla. La presencia de  $\beta$ -galactosidasa expresada por el retrovirus, se determinó por una técnica histoquímica convencional (19).

### C. Análisis de las células endoteliales *in vitro* e *in vivo*

La actividad de la  $\beta$ -galactosidasa se comprueba con la tinción histoquímica en (A) las células endoteliales principales procedentes del minicerdo Yucatán, (B) en una sublínea obtenida a través de la infección con el vector del retrovirus BAG, (C) en un segmento de la arteria normal testigo, (D) en un segmento de arteria instilada con endotelio infectado con el vector retrovívico BAG, (E) con una sección microscópica de la arteria normal testigo, y (F) una sección microscópica de arteria instilada con endotelio infectado con el vector retrovívico BAG.

Las células endoteliales en el cultivo de tejidos se fijaron en 0,5% de glutaraldehído antes de la tinción histoquímica. La actividad enzimática de la proteína  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* se empleó para identificar las células endoteliales infectadas *in vitro* e *in vivo*. El vector Mo-MuLV que transduce la  $\beta$ -galactosidasa (2), (BAG) fue cedido amablemente por la Dra. Constance Cepko. Este vector empleaba la LTR de Mo-MuLV de tipo silvestre como promotor para el gen de la  $\beta$ -galactosidasa. El promotor temprano del virus de simio 40 (SV-40), ligado al gen de resistencia a la neomicina Tn5, proporciona resistencia al fármaco G-418 y se inserta aguas abajo del gen de la  $\beta$ -galactosidasa, proporcionando un marcador para seleccionar las células que expresan  $\beta$ -galactosidasa que contienen el retrovirus. Este retrovirus defectuoso se preparó a partir de células de fibroblasto  $\phi$  am (3, 10) y se mantuvo en medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) y suero de ternera al 10%. Con las células se realizaron pases dos veces a la semana después de la tripsinización. El material sobrenadante con títulos de  $10^4$ - $10^5$ /ml de colonias resistentes a G-418, se añadió a las células endoteliales con dos tercios de confluencia y se incubaron durante 12 horas en DMEM con suero de ternera al 10% a 37°C en CO<sub>2</sub> al 50%, en presencia de 8  $\mu$ g/ml de polibreno. El material sobrenadante vírico se retiró y las células se mantuvieron en medio 199 con 10% de suero de ternera fetal, ECGS (50  $\mu$ g/ml) y medio condicionado para células endoteliales (20%) durante 24 a 48 horas adicionales, antes de seleccionar en G-418 (0,7 pg/ml de una mezcla racémica al 50%). Las células resistentes a G-418 se aislaron y se analizaron en busca de expresión de  $\beta$ -galactosidasa, empleando una tinción histoquímica convencional (9). Las células que expresaban de forma estable la enzima  $\beta$ -galactosidasa, se mantuvieron en cultivo continuo para usarlas cuando fuera necesario. Se almacenaron partes alícuotas congeladas en nitrógeno líquido.

### D. Inmunoterapia del cáncer mediante transferencia génica *in vivo*

Se preparó un vector retrovívico con el gen H-2K<sup>s</sup>. Las células CT26 se infectaron con este vector *in vitro*, se seleccionaron por su resistencia a G418 y se analizaron mediante separación de las células activadas por fluorescencia (FACS). Las células CT26 transducidas mostraban una mayor intensidad media de la fluorescencia que las células CT26 no infectadas o las CT26 infectadas con diferentes vectores retrovívicos. Cuando se inyectaron  $10^6$  células CT26 que expresaban H-2K<sup>s</sup> por vía subcutánea en ratones BALB/c (H-2<sup>d</sup>) sensibilizados frente a este antígeno, no se observaron tumores durante un período de 8 semanas, en comparación con la línea tumoral (H-2<sup>d</sup>) CT26 sin modificar que formaba tumores de forma rutinaria con esa dosis. La respuesta inmune a H-2K<sup>s</sup> podía por tanto proporcionar una protección frente a las células CT26 que eran portadoras de este antígeno. Sin embargo, cuando CT26 H-2K<sup>s</sup> y CT26 se inocularon conjuntamente, se observó crecimiento tumoral, sugiriendo que H-2K<sup>s</sup> confería sensibilidad sólo a las células modificadas.

Para determinar si se pueden conseguir efectos protectores introduciendo H-2K<sup>s</sup> en tumores CT26 en crecimiento, se introdujo el gen informador H-2K<sup>s</sup> o un gen de la  $\beta$ -galactosidasa en los tumores, con ADN/liposoma o un vector retrovívico. Las cápsulas tumorales (0,5-1 cm de diámetro) se expusieron quirúrgicamente y se administraron múltiples

inyecciones con aguja (2-10) en el parénquima. Con los plásmidos informadores de  $\beta$ -galactosidasa, se puede detectar fácilmente la expresión del gen recombinante después de una inyección intratumoral de ADN/liposoma o de vectores retrovíricos.

5 En los ratones que habían recibido inyecciones intratumorales del complejo H-2K<sup>s</sup> más ADN/liposoma o el vector retrovírico con H-2K<sup>s</sup>, el ADN recombinante se detectó por PCR en el tumor y ocasionalmente en otros tejidos. Cuando se encontró en otros órganos, no se detectaron patológicamente evidencias de inflamación o de toxicidad en el órgano. Sin embargo, una respuesta inmune hacia la proteína H-2K<sup>s</sup> recombinante era evidente en estos animales. Los linfocitos obtenidos a partir de los tumores con H-2K<sup>s</sup>, pero no de los tumores transducidos con  $\beta$ -galactosidasa, mostraban una respuesta citolítica frente a H-2K<sup>s</sup>, tanto si se habían entregado con vectores retrovíricos como con liposomas. Más importante, los linfocitos obtenidos a partir de los animales transducidos con H-2K<sup>s</sup>, pero no de los animales transducidos con  $\beta$ -galactosidasa, reconocían y lisaban células CT26 sin modificar, indicando que esta estimulación inducía una reactividad inmune frente a células tumorales sin modificar genéticamente.

15 Para determinar el efecto protector de la respuesta inmune frente a H-2K<sup>s</sup>, se cuantificó el crecimiento tumoral *in vivo*. Cuando los animales no recibían una sensibilización previa a H-2K<sup>s</sup>, uno de cuatro tumores transducidos con H-2K<sup>s</sup> mostraba una atenuación del crecimiento tumoral, el cual no se completó. Por el contrario, no se observó un efecto antitumoral en los testigos sin modificar (n=4) o transducidos con  $\beta$ -galactosidasa (n=4). Debido a que estos tumores eran grandes en el momento de la inyección inicial y continuaban creciendo cuando se generó la respuesta inmune primaria, se realizó un intento de mejorar la respuesta antitumoral, mediante una inmunización previa de los ratones con células tumorales H-2K<sup>s</sup> irradiadas con CT26 y mediante inyecciones más tempranas y/o más frecuentes del vector. Los tumores se transdujeron los días 12 y 32 con una inyección intratumoral de vectores de ADN/liposoma con H-2K<sup>s</sup> o con  $\beta$ -galactosidasa. El tratamiento con el complejo de H-2K<sup>s</sup> y liposoma mejoraba la supervivencia y atenuaba el crecimiento tumoral, por el contrario, los tumores transducidos con  $\beta$ -galactosidasa no se diferenciaban en la tasa de crecimiento al comparar con los testigos sin inyectar. La regresión total del tumor se consiguió en dos ratones, incrementando el número de inyecciones y entregando H-2K<sup>s</sup> en los tumores en un estado previo. Este tratamiento era protector, puesto que los animales testigos mostraban un crecimiento tumoral continuo y no sobrevivían más de 35 días.

#### E. Modulación del sistema inmune

30 La respuesta a la inyección de lípidos catiónicos y de plásmidos se determinó después de la inyección intravenosa en ratones BALB/c (6-12 semanas). En los primeros experimentos, se introdujo un gen que codificaba la molécula de H-2K<sup>s</sup> mediante inyección en la vena de la cola. Dos a cuatro semanas después, se recogieron células del bazo y se analizaron en busca de su capacidad para mediar en una respuesta de linfocitos T citolíticos. Cuando estas células se sometieron a ensayo empleando células diana <sup>51</sup>Cr (linfocitos CT26 que expresaban el gen H-2K<sup>s</sup>), se observó una citólisis significativa que no se había observado en los animales inyectados con el vector testigo,  $\beta$ -galactosidasa (véase la Figura 3). Hasta un 25% de las células diana se lisaron con una relación de efector:diana de 25:1.

40 Además de esta respuesta específica de los linfocitos T citolíticos, se examinaron respuestas serológicas o de anticuerpos frente a genes codificados por los plásmidos del vector de expresión. Cuando se inyecta un plásmido que codifica la molécula gp160 de VIH, se produce una respuesta de los anticuerpos en el ratón tratado. Al contrario que en los animales testigos inyectados con lípidos catiónicos que contienen  $\beta$ -galactosidasa, los ratones inyectados con lípidos catiónicos con el plásmido gp160, mostraban una respuesta de los anticuerpos hacia la forma gp160 y gp120 de esta molécula, mediante transferencia de tipo Western (véase la Figura 4). Estos resultados muestran que la administración sistémica de complejos de lípido catiónico/ADN se puede utilizar con éxito para inducir una inmunidad mediada con células y mediada con anticuerpos contra patógenos ajenos.

#### F. Determinación de las condiciones para una transfección óptima

##### 50 (1) Construcción del plásmido

Un plásmido que contiene el gen lacZ de *E. coli*, bajo el control del LTS del virus del sarcoma de Rous (RSV- $\beta$ -gal) (Norton y Coffin, *Mol. Cell. Biol.*, 5(2), 281-290, 1985) se empleó para la transfección de células endoteliales primarias de cerdo y células HeLa. Además, un plásmido que contenía el gen lacZ bajo el control del ADN que flanquea en 5' la preproendotelina-1 (-1410 hasta +83) (Wilson y col., *Mol. Cell. Biol.*, 10(9), 4854-4862, 1990) se empleó para la transfección de células endoteliales. Para un análisis de la toxicidad *in vivo*, se empleó el plásmido RSV- $\beta$ -gal y un plásmido obtenido a partir del vector PLJ que contiene el ADNc que codifica un gen de la clase I del MHC de ratón H-2K<sup>s</sup>.

##### 60 (2) Cultivo celular, Análisis de la transfección y Toxicidad *in vitro*

Las células endoteliales primarias, obtenidas a partir del minicerdo Yucatán (células YPE), se incubaron con medio 199 (M199) suplementado con 10% de FBS, 1-glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 5  $\mu$ g/ml de estreptomicina. Las células HeLa se mantuvieron en medio Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) suplementado con 5% de FBS, 1-glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 5  $\mu$ g/ml de estreptomicina. La mezcla de ADN y liposoma se preparó con concentraciones de lípido de DOPE/DC-chol entre 2,5 y 25  $\mu$ M, añadidas a 0,2 ml de medio exento de suero o solución de lactato de Ringer en tubos de poliestireno. Después de mezclar suavemente, la solución se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Para el análisis de la transfección, se dejaron crecer las células en

placas de cultivo de tejidos de 60 mm con 75% de confluencia o superior. Las células se lavaron dos veces con medio exento de suero o solución de lactato de Ringer y a continuación se colocaron en 0,5 ml del mismo medio. La solución de ADN y liposomas (0,2 ml) se añadió a continuación lentamente a las células, con agitación suave, hasta tener un volumen final de 0,7 ml. Esto dio como resultado unas concentraciones de ADN entre 0,7 y 7  $\mu\text{g/ml}$  (13-130 nM) y concentraciones de lípido de 7-70  $\mu\text{M}$ . La transfección se realizó durante 1-5 horas, después de lo cual las células se colocaron en medio suplementado tal y como se ha descrito anteriormente. De 24-48 horas después de la transfección, la actividad enzimática de la proteína  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* se empleó para identificar las células transfectadas, mediante tinción con el cromógeno X-gal. La toxicidad *in vitro* se determinó mediante efecto citopático o por exclusión con azul tripán.

### (3) Estudios animales

Para las inyecciones intravenosas, los complejos de ADN/liposomas se prepararon tal y como se ha descrito para los estudios de la transfección *in vitro*, en 0,2 ml de M199 exento de suero o solución Ringer con lactato. Después de incubar durante 15-20 minutos, la mezcla se diluyó hasta 0,7 ml y 0,1 a 0,2 ml de esta dilución se inyectaron inmediatamente a continuación en la vena de la cola de un ratón adulto, hembra BALB/c. Antes de la inyección se recogió sangre y 9-11 días después de la inyección y se examinaron las características químicas del suero. Unas 2 o 3 semanas después de la inyección, se extirparon el hígado, los riñones, el pulmón, el corazón y el cerebro para un análisis histológico y de amplificación del ADN con PCR, tal y como se ha descrito previamente. La inyección intratumoral de células CT26 (Fearon y col., *Cell*, 60, 397-403, 1990) y el análisis también se realizaron según con los protocolos anteriores.

### (4) Resultados

Las condiciones óptimas para la transfección y la toxicidad de los ADN/liposomas se determinaron inicialmente *in vitro*. Para obtener una transfección máxima sin toxicidad *in vitro*, se estudió la relación de ADN frente a lípido catiónico, la concentración absoluta de ADN o de lípidos y las condiciones para la mezcla de ADN y lípidos catiónicos. La preparación de lípidos catiónicos era una formulación de dos compuestos, que incluían dioleil-fosfatidil-etanolamina (DOPE) y coles-ter-3- $\beta$ -ol 3 uretanil-N',N'-dimetiletilen diamina (DC-Chol). Las eficacias de la transfección de este reactivo eran iguales o superiores a las de la Lipofectin® (BRL) en diversas líneas celulares *in vitro*. Las células endoteliales que eran típicamente difíciles de transfectar y las células HeLa, que se pueden transfectar fácilmente empleando una variedad de técnicas, se examinaron mediante transfección *in vitro*.

Para determinar las condiciones óptimas para la transfección de las células endoteliales, el lípido se empleó inicialmente con concentraciones diferentes, mientras que la concentración de ADN se mantuvo constante. La eficacia máxima de la transfección se observó empleando 0,7  $\mu\text{g/ml}$  de ADN (13 nM) y 21  $\mu\text{M}$  del lípido DPE/DC-Chol con una disminución marcada del número de células transfectadas con mayor o menor concentración de lípidos. A continuación, se alteró la concentración de ADN mientras que la concentración de lípido permaneció constante. Este análisis reveló una sensibilidad similar a la concentración de ADN, disminuyendo significativamente el número de células transfectadas con incrementos de la concentración de ADN tan bajos como 0,4  $\mu\text{g/ml}$ . Estos resultados indican que la relación de ADN frente a lípido es importante para una eficacia máxima de la transfección y que la concentración absoluta de cada componente también es importante para determinar la eficacia de la transfección. Un incremento de la concentración de ADN y de lípido superior a la concentración óptima de 0,7  $\mu\text{g/ml}$  de ADN (13 nM) y 21  $\mu\text{M}$  de DOPE/DC-Chol, reducía el número de células viables y no incrementaba la eficacia de la transfección de las células viables restantes. Concentraciones de lípido superiores a 35  $\mu\text{M}$  reducían el número de células viables en 50%, comparadas con el testigo sin transfectar, mientras que la concentración óptima de 0,7  $\mu\text{g/ml}$  de ADN (13 nM) y 21  $\mu\text{M}$  de lípido no tenía ningún efecto sobre la viabilidad celular después de 5 horas de incubación.

Para comparar las concentraciones óptimas de la transfección en un tipo celular diferente, se realizaron transfecciones sobre células HeLa. En este caso, se observó una relación óptima ligeramente diferente de ADN y lípido. Las eficacias pico de la transfección se obtuvieron con la misma concentración de lípido que las células endoteliales (21  $\mu\text{g/ml}$ ) pero variaba poco con ligeras diferencias en las concentraciones de ADN. Las concentraciones de ADN de 1,4-4,2  $\mu\text{g/ml}$  eran igualmente eficaces. De nuevo, cuando la relación de ADN frente a lípido se mantenía pero la concentración de cada uno disminuía tres veces, se transfectaron muy pocas células, ilustrando que la relación de ADN frente a lípido y la concentración absoluta de cada componente, eran importantes para mejorar el número de células transfectadas. Si las células HeLa se transfectaban con >80% de confluencia o superior, no había toxicidad empleando hasta 35  $\mu\text{M}$  de lípido. Sin embargo, cuando las células se transfectaban con una densidad de saturación menor, la viabilidad celular se reducía drásticamente sólo con 7  $\mu\text{M}$  de lípido, comparado con las células testigo sin transfectar. Estos resultados muestran que las condiciones óptimas para la transfección y la toxicidad pueden diferir algo, dependiendo de la línea celular.

Otra variable en la preparación de liposomas era la composición de la solución empleada para generar complejos de los lípidos catiónicos con ADN. Entre diversas soluciones de medios analizados, no se observaron diferencias sustanciales en la eficacia de la transfección ni en la toxicidad con los medios M199, McCoy's, OptiMEM o RPMI. Sin embargo se observó una mejora significativa en la eficacia de la transfección empleando lactato de Ringers convencional. El número de células transfectadas se incrementaba más de tres veces comparado con el medio exento de suero, aunque una incubación prolongada ( $\geq 2$  horas) daba como resultado una pérdida de la viabilidad celular en algunos tipos celulares.

**Publicaciones citadas**

1. J. S. **Reitman**, R. W. **Mahley**, D. L. Fry, *Atherosclerosis* 43, 119 (1982).
- 5     2. R. E. **Pitos**, T. L. **Innerarity**, J. N. **Weinstein**, R. W. **Mahley**, *Arteriosclerosis* 1, 177 (1981); T. J. C. van **Berkel**, J. F. **Kruijt**, *FEBS Lett.* 132, 61 (1981); J. C. **Voyta**, P. A. **Netland**, D. P. **Via**, E. P. **Zetter**, *J. Cell. Biol.*, 99, 81A (resumen) (1984); J. M. **Wilson**, D. E. **Johnston**, D. M. **Jefferson**, R. C. **Mulligan**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 4421 (1988).
- 10     3. J. **Price**, D. **Turner**, C. **Cepko**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 156 (1987).
4. R. **Mann**, R. C. **Mulligan**, D. **Baltimore**, *Cell*, 33, 153 (1983); C. L. **Cepko**, B. E. **Floberts**, R. c. **Mulligan**, *Cell*, 37, 1053 (1984); M. A. **Eglitis**, W. F. **Anderson**, *Biotechniques*, 6, 608 (1988).
- 15     5. S. G. **Ellis**, G. S. **Roubin**, S. B. **King**, J. S. **Douglas**, W. S. **Weintraub** y col., *Circulation*, 77, 372 (1988); L. **Schwartz**, M. G. **Bourassa**, J. **Lesperance**, H. E. **Aldrige**, F. **Kazim** y col., *N. Engl. J. Med.*, 318, 1714 (1988).
6. P. C. **Block**, R. K. **Myler**, S. **Stertz**, J. T. **Fallon**, *N. Engl. J. Med.* 305, 382 (1981); P. M. **Steele**, J. H. **Chesebro**, A. W. **Stanson**, *Circ. Res.* 57, 105 (1985); J. R. **Wilentz**, T. A. **Sanborn**, C. C. **Handenschild**, C. R. **Valeri**, T. J. **Ryan**, D. P. **Faxon**, *Circulation*, 75, 636, (1987); W. **McBride**, R. A. **Lange**, L. D. **Hillis**, *N. Engl. J. Med.*, 318, 1734 (1988).
- 20     7. J. **Folkman**, M. **Klagsbrun**, *Science* 235, 442 (1987); S. J. **Leibovich**, P. J. **Polverini**, H. **Michael Shepard**, D. **M. Wiseman**, V. **Shively**, N. **Nuseir**, *Nature*, 329, 630 (1987); J. **Folkman**, M. **Klagsbrun**, *Nature* 329, 671 (1987).
- 25     8. T. **Matsumura**, T. **Yamanka**, S. **Hashizume**, Y. **Irie**, K. **Nitta**, *Japan. J. Exp. Med.*, 45, 377 (1975); D. G. S. **Thilo**, S. **Muller-Kusel**, D. **Heinrich**, I. **Kauffer**, E. **Weiss**, *Artery*, 8, 25a (1980).
9. A. M. **Dannenberg**, M. **Suga**, en *Methods for Studying Mononuclear Phagocytes*, D. D. Adams, P. J. Edelson, H. S. Koren, compiladores (*Academic Press*, Nueva York, 1981), págs. 375-395.
- 30     10. R. D. **Cone**, R. C. **Mulligan**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 6349 (1984).

Se debe entender que, dentro del alcance de las reivindicaciones anejas, la invención se puede poner en práctica de un modo distinto al descrito específicamente en esta memoria.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una secuencia de ADN o de ARN y un vehículo para la secuencia seleccionada a partir del grupo  
consistente en vectores víricos, que facilita la entrega *in vivo* de la secuencia a células tumorales, para la fabricación  
de un medicamento para tratar un tumor en un mamífero mediante inyección directa del medicamento en el tumor  
o en el sitio del tumor, de modo que las células del tumor se transforman, en donde la secuencia de ADN o de  
ARN es un miembro seleccionado entre el grupo consistente en secuencias de ADN o de ARN que codifican agentes  
estimulantes/inhibidores del sistema inmune y del crecimiento, que incluyen inductores de la diferenciación, tales  
como agentes estimulantes que incluyen la interleucina-2, la interleucina-3, la interleucina-4, la interleucina-6, agentes  
inhibidores/inductores de la diferenciación tales como TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, interleucina-1 e interferones.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha secuencia de ADN o de ARN se obtiene a partir de  
una especie que es la misma que dicho mamífero.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha secuencia de ADN o de ARN se obtiene a partir de  
una especie diferente a la especie de dicho mamífero.

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vehículo es un vector retrovílico o adenovílico.

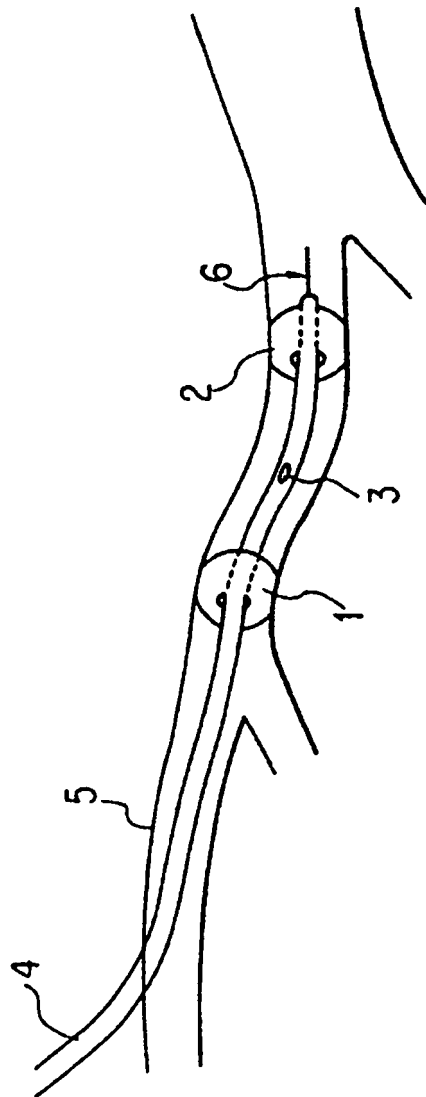


FIG.1

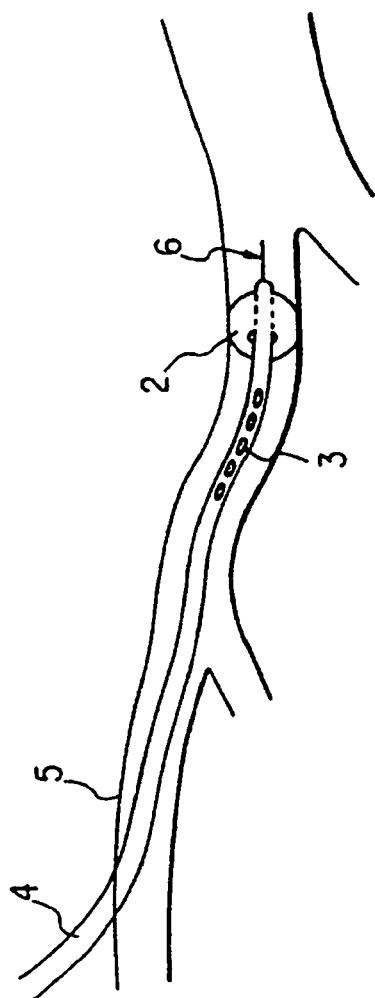
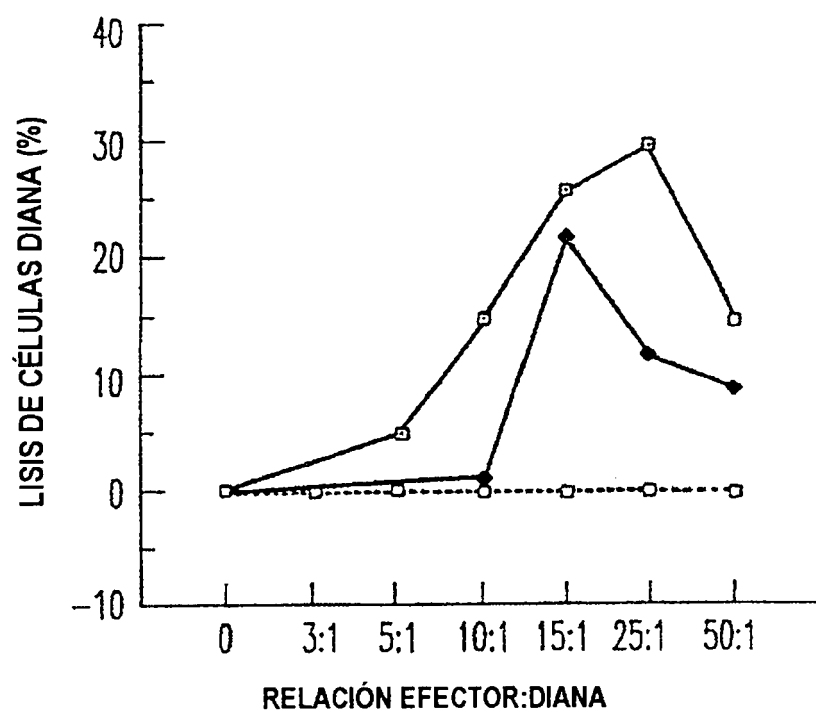


FIG.2

*FIG. 3*



INYECCIONES IV

□ — SOLUCIÓN C/H-2Ks

◆ — LIPOFECTINA/ H-2Ks

□ - - - LIPOFECTINA/ RSV-B-GAL

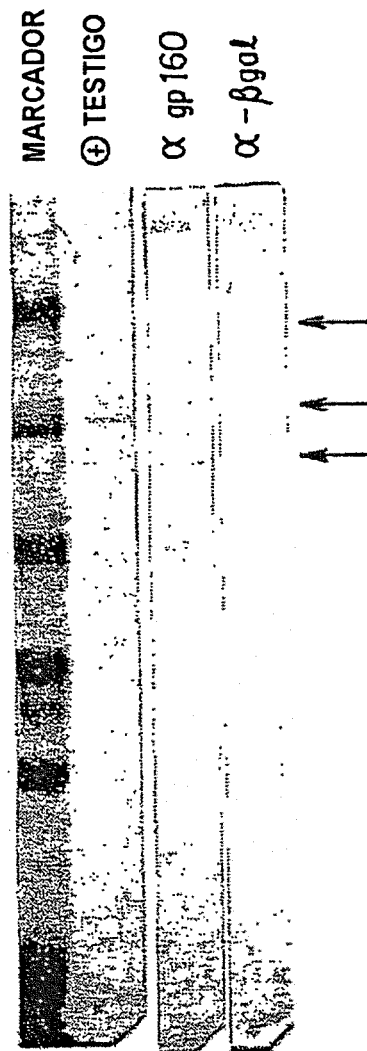


FIG. 4