



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 276 470**

⑤1 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **98939886 .2**

⑧6 Fecha de presentación : **12.08.1998**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1003533**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2000**

⑤4 Título: **Utilización de vectores de herpes para la terapia tumoral.**

③0 Prioridad: **12.08.1997 US 55142 P**
22.04.1998 US 64174

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2007

⑦3 Titular/es: **Georgetown University**
37th & O Streets, N.W.
Washington, District of Columbia 20057, US

⑦2 Inventor/es: **Rabkin, Samuel, D.;**
Toda, Masahiro y
Martuza, Robert, L.

⑦4 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

DESCRIPCIÓN

Utilización de vectores de herpes para la terapia tumoral.

5 **Antecedentes de la invención**

La inducción de inmunidad específica contra los tumores es una estrategia atractiva de terapia antineoplásica debido a la perspectiva de utilizar los propios mecanismos de defensa del organismo, en lugar de utilizar agentes terapéuticos tóxicos estándar, con el fin de proporcionar una protección a largo plazo contra la existencia de los tumores, su
10 crecimiento y recurrencia. Tal estrategia es atractiva debido a su capacidad de destruir pequeños tumores metastáticos que podrían escapar a la detección y poder proporcionar inmunidad contra los tumores recurrentes.

En principio, una inmunoterapia debería depender de la presencia de antígenos específicos de los tumores y de la capacidad para inducir una respuesta inmune citotóxica que reconoce a las células tumorales que presentan los
15 antígenos. Los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen a las moléculas del principal complejo de histocompatibilidad (MHC) de clase I acopladas a péptidos derivados de las proteínas celulares presentadas en la superficie celular en combinación con moléculas coestimulantes. Mueller *et al.*, [*Annu. Rev. Immunol.* 7:445-480 (1989)]. De hecho, se han detectado antígenos específicos de los tumores en una multiplicidad de tumores humanos. Roth *et al.*, [*Adv. Immunol.*, 57:281-351 (1994); Boon *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 12:337-365 (1994)].

Algunas estrategias de vacunación antineoplásica se han concentrado en la utilización de células tumorales muertas u homogeneizados celulares en combinación con un adyuvante o citocina. Más recientemente, se ha utilizado transferencia génica de citocinas, moléculas de MHC, moléculas coestimulantes o antígenos tumorales a las células tumorales con el fin de amplificar la visibilidad de las células tumorales a las células inmunes efectoras. Dranoff & Mulligan,
20 *Adv. Immunol.* 58:417-454 (1995).

Sin embargo, la utilización terapéutica de "vacunas antitumorales" ha presentado dificultades importantes. En particular, las estrategias convencionales requieren que se obtengan y cultiven las células tumorales autólogas de un paciente para su manipulación *in vitro*, irradiación y subsiguiente vacunación, o para la identificación y purificación
25 de los antígenos tumorales específicos.

Sumario de la invención

Por consiguiente un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento destinado a
35 inducir una respuesta antitumoral sistémica en un paciente que presenta o corre el riesgo de desarrollar múltiples tumores metastáticos, sin manipular las células tumorales autólogas del paciente o identificar o purificar antígenos específicos.

Es asimismo un objetivo de la presente invención proporcionar vectores con el fin de efectuar el presente procedimiento.
40

Con el logro de estos y otros objetivos, la presente invención describe procedimientos destinados a inducir una respuesta inmune antitumoral sistémica en un paciente que presenta, o que corre el riesgo de desarrollar, múltiples tumores metastáticos de un tipo celular determinado.
45

La presente invención se refiere a la utilización de una composición que comprende un virus herpes simples (HSV) que se replica en las células en división y muestra una replicación atenuada en las células que no se dividen que comprende una o más secuencias de nucleótidos expresables que codifican una o más citocinas o por lo menos otro inmunomodulador y vehículos farmacéuticamente aceptables para el virus destinado a la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de las metástasis de un tumor de determinado tipo celular que induce una
50 reacción inmune antitumoral sistémica en un paciente que presenta o corre el riesgo de desarrollar múltiples tumores metastáticos de determinado tipo celular, en el que el medicamento es adecuado para inocular un tumor en un paciente.

Según otra forma de realización de la presente invención, el virus es de replicación defectuosa. Todavía en otra forma de realización, el virus es de replicación condicionalmente competente. De acuerdo con otra forma de realización, el virus es de una cepa de vacuna.
55

También se describen virus mutados de utilización en los procedimientos de la presente invención p.ej., un virus herpes simplex que es incapaz de expresar tanto (i) un producto funcional del gen $\gamma 34.5$, como (ii) una polinucleótido reductasa, en el que el genoma del virus comprende por lo menos una secuencia de nucleótidos expresable que codifica por lo menos un inmunomodulador. Además, se describe un mutante tsK de ICP4 del virus herpes simplex, el genoma del cual ha sido modificado con el fin de que incorpore por lo menos una secuencia de nucleótidos expresable que codifica por lo menos un inmunomodulador.
60

Con la publicación de la presente memoria, estos y otros objetivos y aspectos de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia.
65

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra que la inoculación intratumoral de tumores CT26 en ratones BALB/c con G207 inhibe el crecimiento del tumor inoculado (Ft) y de un tumor no-inoculado en un lugar distante (It). Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 6 ratones por grupo. Volumen tumoral = (ancho x largo x alto).

La Figura 1B muestra que la inoculación intradérmica de los tumores CT26 en ratones BALB/c con G207 no tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de los tumores. Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 6 ratones por grupo. Volumen tumoral = (ancho x largo x alto).

La Figura 1C muestra que el incremento de la dosis intratumoral de G207 produce una disminución del crecimiento tumoral bilateral de los tumores CT26 en ratones BALB/c. Las barras muestran el promedio de 6 animales por grupo.

La Figura 2 muestra que la inoculación intratumoral de células M3 de melanoma de ratón en ratones DBA/2 con G207 inhibe el crecimiento del tumor inoculado (rt) y de un tumor distante no inoculado (lt). Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 6 ó 7 ratones por grupo. Volumen tumoral = (ancho x largo x alto).

La Figura 3 muestra que la inoculación intratumoral de las células de neuroblastoma N18 en ratones singénicos A/J con G207 inhibe el crecimiento del tumor inoculado (tumor izquierdo) y de un tumor distante no inoculado (tumor derecho). Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 8 ratones por grupo. Volumen tumoral = (ancho x largo x alto).

La Figura 4 muestra que la inoculación intratumoral de tumores CT26 en ratones BALB/c con tsK inhibe el crecimiento del tumor inoculado (Rt) y de un tumor distante no inoculado (Lt). Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 6 animales por grupo. Volumen tumoral = (ancho x largo x alto).

La Figura 5A muestra el plásmido pHCL-tk. La Figura 5B muestra el plásmido pHCIL12-tk.

La Figura 6 muestra la secreción de IL-12 en las células inoculadas con dvIL12/G207.

La Figura 7 muestra que la inoculación intratumoral de tumores CT26 en ratones BALB/c con dvlacZ/G207 o dvIL12/G207 inhibe el crecimiento del tumor inoculado (Rt) y de un tumor distante no inoculado (Lt). Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 6 ratones por grupo. Volumen tumoral = (ancho x largo x alto).

La Figura 8 muestra la proporción de ratones supervivientes después de la inoculación con dvlacZ/G207, dvIL12/G207 o simulado.

La Figura 9 muestra que la inoculación de tumores CT26 en ratones BALB/c con dvIL12/tsK o dvlacZ/tsK inhibe el crecimiento del tumor inoculado (Rt) y de un tumor distante no inoculado (Lt). Las barras representan las medias $\pm$ SEM de 6 ratones por grupo. Volumen tumoral = (ancho x largo x alto).

La Figura 10 muestra la proporción de ratones supervivientes después de la inoculación con dvlacZ/tsK, dvIL12/tsK o simulado.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

Se ha desarrollado una nueva estrategia mejorada con el fin de inducir una respuesta inmune sistémica en los pacientes que muestran múltiples tumores metastáticos. De acuerdo con dichos desarrollos, la presente invención describe un procedimiento de inducción de una respuesta inmune antitumoral sistémica en un paciente que muestra o corre el riesgo de desarrollar múltiples tumores metastáticos mediante la inoculación de por lo menos un tumor con un virus herpes simplex mutado (HSV). La inoculación invoca una respuesta tumoral antitumoral muy específica que mata las células del tumor inoculado, así como también las células de tumores distantes establecidos no inoculados.

La capacidad de tratar a los pacientes que presentan múltiples tumores metastáticos representa una ventaja significativa sobre las estrategias convencionales que se centran en el tratamiento de una única masa tumoral. La eficacia de las estrategias citotóxicas convencionales a base de vectores víricos depende de la infección vírica de todas las células tumorales en el paciente. Sin embargo, es extremadamente difícil obtener una distribución amplia o sistémica de los vectores víricos *in vivo* y por consiguiente es difícil infectar todas las células tumorales en un paciente que presenta múltiples tumores metastáticos. La utilización de la presente invención, que no necesita dirigir un vector vírico a cada célula tumoral, ofrece, por consiguiente, una clara mejora sobre dichos procedimientos. Además, mediante las mejoras recientes en la terapia antitumoral de los tumores primarios, muchos pacientes sobreviven más tiempo y corren el riesgo de desarrollar múltiples tumores metastáticos. En consecuencia, la capacidad de tratar dichos pacientes con eficacia es una mejora necesaria en la terapia antitumoral.

Los virus utilizados de acuerdo con la presente invención son virus herpes simplex mutados que infectan las células tumorales pero no se esparcen o se replican con eficacia en las células normales o tejidos, sin producir, por consiguiente, enfermedad o patología por sí mismos. Por ejemplo, un virus que se replica en las células que se dividen y muestra una replicación atenuada en las células que no se dividen es de utilidad de acuerdo con la presente invención, como también lo es un virus que se replica defectuosamente. El virus puede ser de tipo 1 (HSV-1) o de tipo 2 (HSV-2).

2). Se han utilizado múltiples mutantes de HSV-1 para terapias citotóxicas locales de tumores con el fin de destruir las células tumorales *in situ* pero evitando el tejido normal. Mineta *et al.*, *Nature Medicine* 1:938-43 (1995); Martuza *et al.*, *Science* 252:854-56 (1991); Boviatsis *et al.*, *Gene Therapy* 1:323-331 (1994); Randazzo *et al.*, *Virology* 211:94-101 (1995); Andreansky *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11313-18 (1996). De acuerdo con la presente invención se puede utilizar uno cualquiera de estos mutantes, lo mismo que las cepas de vacunas de HSF. Se encuentra disponible una multiplicidad de fármacos antivíricos (es decir, aciclovir y foscarnet) contra los virus herpes que permitirían tratar una dispersión vírica imprevista.

En una forma preferida de la presente invención, el virus se replica en las células que se dividen y muestra una replicación atenuada en las que no se dividen. Por ejemplo, la patente US nº 5.585.096 describe un virus adecuado, ilustrado por la cepa G207, que es incapaz de expresar tanto (i) un producto funcional del gen γ 34.5 como (ii) una ribonucleótido reductasa. (El contenido de la patente US nº 5.585.096 se incorpora a la presente memoria como referencia). G207 se replica en las células que se dividen, produciendo una infección lítica que tiene como consecuencia la muerte de las células, pero está muy atenuado en las células que no se dividen, dirigiendo de este modo la dispersión del virus a las células tumorales. El G207 no es patógeno y no produce enfermedad detectable en los ratones y en los primates no humanos. Mineta *et al.*, *Nature Medicine* 1:938-43 (1995).

En relación a otro aspecto de la presente invención, el virus es de replicación defectuosa. Un ejemplo de tal virus es el tsK, un mutante del virus herpes simplex sensible a la temperatura en ICP4. Davison *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 65:859-63 (1984). La capacidad de tsK de replicarse es dependiente de la temperatura, siendo 31,5°C permisivos para la replicación y 39,5°C no permisivos. TsK tiene una capacidad variable de replicación entre estas dos temperaturas. Debido a que la temperatura del cuerpo es de aproximadamente 39,5°C, se espera que tsK se replique defectuosamente *in vivo*. Esto se ha confirmado mediante experimentos *in vivo* con tsK en ratas.

Según otro aspecto de la presente invención, el virus es de replicación condicionalmente competente. Un ejemplo de tal virus es el G92A, cuya capacidad para replicarse es dependiente del tipo celular. El G92A se describe con mayor detalle en la solicitud US con número de serie 08/486.147, presentada el 7 de Junio de 1995, cuyo contenido se incorpora a la presente memoria como referencia.

La invención describe además una composición que consiste esencialmente en el virus de herpes simplex y un vehículo farmacéuticamente aceptable, que se administra a un paciente que sufre o que corre el riesgo de desarrollar múltiples tumores metastáticos. La composición se administra directamente a las células tumorales *in situ*. En la presente descripción, la frase "consistente esencialmente de" excluye una etapa u otras características que afectarían significativamente a un aspecto material de la presente invención. De este modo calificada, una composición de la presente invención incluiría, por ejemplo, el virus herpes simplex prescrito sin ningún otro virus o vector vírico defectivo; ello es debido a que un virus adicional complicaría el protocolo de la invención. La invención comprende asimismo la administración de la presente composición en combinación con otra terapia, tal como quimioterapia o radioterapia.

Se puede administrar más de un virus herpes simplex mutado. La presente forma de realización se puede realizar mediante la administración de una composición única que comprende más de un virus de herpes simplex mutado y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el virus, o mediante la administración de más de una composición, comprendiendo cada una de las composiciones por lo menos un virus de herpes simplex mutado y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el virus o los virus. Por ejemplo, se puede administrar una composición que comprende (A) un primer virus de herpes simplex mutado, (B) un segundo virus de herpes simplex mutado y (C) un vehículo farmacéuticamente aceptable para los virus. Además, se puede administrar una composición que consiste esencialmente de (A) un primer virus de herpes simplex mutado, (B) un segundo virus de herpes simplex mutado y (C) un vehículo farmacéuticamente aceptable para los virus. Tal como se describió anteriormente, la frase "consistente esencialmente de" excluye una etapa u otra características que afecten de modo significativo a un aspecto material de la presente invención. Por consiguiente, la presente forma de realización consistiría de, por ejemplo, la administración del primer y del segundo virus herpes simplex prescrito sin ningún otro virus o vector vírico.

La inoculación de un tumor con uno o más virus de herpes simplex mutado de acuerdo con la presente invención induce una respuesta inmune antitumoral específica que es específica del tipo celular del tumor inoculado y que mata células en el tumor inoculado y en otros, tumores no inoculados. La muerte celular inducida se observa, por ejemplo, como un crecimiento tumoral inhibido o como un tamaño tumoral reducido. En el ejemplo que se da a conocer a continuación, la muerte celular inducida se observa como una inhibición del crecimiento de tumor inoculado y de tumores distantes establecidos no inoculados. En algunos casos, los tumores se encogen a tamaños indetectables. En uno de los modelos murinos estudiados, CT26, la respuesta inmune se correlaciona con los linfocitos citotóxicos T (CD8⁺) que reconocen el péptido de clase I restringida del principal complejo de histocompatibilidad (MHC) que es un antígeno tumoral dominante.

Tal como se discutió anteriormente, la composición se administra directamente a las células tumorales del paciente, *in situ*. Ello se realiza mediante los procedimientos conocidos en la materia, por ejemplo, mediante inoculación intratumoral durante la cirugía, tal como la cirugía para reducir un tumor, en melanomas externos, o estereotácticamente en el lecho del tumor. También son adecuadas otras estrategias de direccionamiento hacia los tumores. En general, se administra la máxima dosis segura a intervalos semanales si el tumor es de fácil acceso, o se administra durante la cirugía o la biopsia del tumor.

El vehículo farmacéuticamente aceptable del virus se puede seleccionar de entre los vehículos farmacéuticamente aceptables conocidos, y debe ser uno en el que el virus es estable. Por ejemplo, puede ser un diluyente, disolvente, tampón y/o conservante. Un ejemplo de vehículo farmacéuticamente aceptable es el tampón fosfato que contiene NaCl. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables de disoluciones acuosas, excipientes no tóxicos que incluyen sales, conservantes, tampones y semejantes, se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed. Easton: Mack Publishing Co. Pp 1405-1412 y 1461-1487 (1975) y The National Formulary XIV., 14th Ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975), el contenido de los cuales se incorpora a la presente memoria como referencia.

Huang *et al.*, *Science* 264:961-65 (1994), demostraron que el cebado de la respuesta inmune contra el antígeno tumoral MHC de clase I restringida implica la transferencia de dicho antígeno a la mayoría de las células presentadoras de antígenos (APC) derivadas de la médula ósea del huésped antes de su presentación a las células T CD8⁺. Sin la intención de limitarse a ninguna teoría, los inventores creen que la infección local de un tumor con HSV puede inducir a los precursores circulantes a diferenciarse a APC. Un subconjunto de los macrófagos capaz de presentar antígenos exógenos en moléculas MHC de clase I a los clones de células T CD8⁺. Rock *et al.*, *J. Immunol.*, 150:438-46 (1993). La destrucción lítica o muerte víricamente inducida de las células tumorales puede liberar antígenos tumorales que son entonces recogidos por las APC y transportados a los ganglios linfáticos de drenaje. En éstos serían procesados y presentados a las células T CD8⁺. El reconocimiento asociativo de antígenos específicos de HSV y específicos del tumor puede tener también una función en la intensidad de la respuesta. Las células tumorales infectadas con los HSV competentes en la replicación tendrían viriones maduros brotando de sus membranas celulares y también podrían procesar los antígenos víricos para la presentación en la clase I de MHC de modo semejante a como lo hacen las APC. Por consiguiente, las células tumorales infectadas con HSV podrían inducir reacciones inmunes mediadas por las células T directamente. Parte de la reacción inmune que es inducida mediante la presentación conjunta de antígenos víricos y tumorales podría ser disparada más adelante mediante solamente uno de los antígenos expresados conjuntamente.

Según la presente invención, se administra a las células tumorales uno o más inmunomoduladores además del virus de herpes simplex mutado descrito anteriormente. Los ejemplos de inmunomoduladores de utilidad en la presente invención incluyen citocinas, moléculas coestimuladoras y quimioquinas. La administración de uno o más inmunomoduladores se puede realizar, por ejemplo, mediante un virus mutado de herpes simplex que comprende una o más secuencias expresables de nucleótidos que codifican una o más citocinas u otros genes de inmunomoduladores, o mediante más de un virus mutado de herpes simplex, cada uno de los cuales comprende una o más secuencias expresables de nucleótidos que codifican una o más citocinas u otros genes inmunomoduladores. También se pueden utilizar vectores víricos que no son de virus herpes simplex con el fin de administrar uno o más inmunomoduladores. Por ejemplo, de acuerdo con la presente forma de realización se pueden utilizar uno o más vectores adenovíricos, vectores de virus asociados a adenovirus, vectores retrovíricos o vectores del virus vaccinia que comprenden una o más secuencia expresables de nucleótidos que codifican uno o más genes inmunomoduladores. Véase, p.ej., Shawler *et al.*, *Adv. Pharmacol.*, 40:309-37 (1997), que expone la transferencia de genes de citocinas inmunomoduladoras.

Los ejemplos de inmunomoduladores de utilización en la presente invención incluyen IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, G-CSF, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , TNF- α y B7. Véase, por ejemplo, Parmiani *et al.*, *Adv. Pharmacol.*, 40:259-89 (1997); Shawler *et al.*, *Adv. Pharmacol.*, 40:309 (1997). Por su conveniencia, en la exposición siguiente se ejemplifica la utilización de la IL-12. Se deberá entender, sin embargo, que se pueden utilizar otros inmunomoduladores en lugar o además de éste. Además, cuando la presente descripción se refiere a "un inmunomodulador", se deberá entender que la presente invención comprende uno o más inmunomoduladores.

La citocina IL-12 es una citocina heterodimérica, compuesta de subunidades de 35 kD (p35) y 40 kD (p40), que se unen a los receptores presentes en las células NK y T. El receptor de alta afinidad está compuesto de dos subunidades de receptor tipo- β de citocina que se comportan individualmente como receptores de baja afinidad. La IL-12 es multifuncional en el sistema inmune, amplificando la proliferación y la actividad citotóxica de las células T y NK, regulando la producción de IFN- γ y promocionando el desarrollo de las células auxiliares CD4⁺ (Th1).

La actividad antitumoral de la IL-12 se ha demostrado en múltiples modelos diferentes de tumores murinos, tanto sólidos como metastáticos, mediante la administración sistémica de IL-12 recombinante, células tumorales o fibroblasto modificados para la secreción de IL-12 y vectores víricos para la expresión de IL-12. La inmunoterapia con IL-12 es menos efectiva con otras líneas celulares tumorales tales como CT26, C26, MCH-1-A1 y TS/A. Zitvogel *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 26:1335-41 (1996). Se ha demostrado que la administración sistémica de rIL-12 tiene un potente efecto antitumoral en múltiples modelos animales. La prologada exposición a la IL-12, sin embargo, puede tener efectos secundarios deletéreos tales como los observados con muchas de las citocinas.

La transferencia de genes inmunomoduladores directamente a las células tumorales es ventajosa debido a que los genes se expresan en el tumor en lugares en concierto con los antígenos tumorales putativos. Según la presente invención, por consiguiente, los tumores se modifican *in situ* para hacer que las células sean una fuente de producción de inmunomodulador.

Tal como se ha discutido anteriormente, la respuesta inmune inducida de acuerdo con la presente invención mata las células del tumor inoculado y mata también las células no inoculadas del tumor, lo que incluye las células tumores distantes no inoculadas. Tal efecto hace que este procedimiento sea de particular utilidad en el tratamiento de pacientes que presentan múltiples tumores metastáticos de un tipo celular en particular. También representa una mejora en el

tratamiento de tumores localizados no metastáticos debido a que el procedimiento mata también células tumorales a las que no se dirige directamente el virus administrado.

Según la presente invención se puede tratar cualquier tipo de tumor, lo que incluye los tumores no metastáticos, tumores con potencial metastático y tumores que han demostrado ya su capacidad metastática. Los ejemplos de tipos de células tumorales que se pueden tratar según la presente invención incluyen los tipos celulares de astrocitoma, oligodendroglioma, meningioma, neurofibroma, glioblastoma, ependimoma, Schwannoma, neurofibrosarcoma y meduloblastoma. La invención también es de utilidad en el tratamiento de células de melanoma, células de cáncer de páncreas, células de carcinoma de próstata, células de cáncer de cabeza y cuello, células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de colon, células de linfoma, células de hepatoma, células de cáncer de ovario, células de cáncer renal, neuroblastomas, células de carcinoma escamoso, sarcomas y células de mesotelioma y carcinoma epidermoide.

Las formas de realización de la presente invención se ilustran además a partir de los ejemplos que muestran aspectos de la invención detalladamente. Tales ejemplos ilustran aspectos específicos de la invención sin limitar su alcance.

Ejemplos

Ejemplo 1

Eficacia antitumoral de G207 en la línea celular CT26

Se evaluó la eficacia antitumoral de G207 en un modelo bilateral subcutáneo establecido con células CT26 tal como se describe a continuación.

Línea celular

La línea celular CT26 de carcinoma colorrectal murino se ha utilizado ampliamente como modelo de tumor sinérgico para estudiar la inmunoterapia. Fearon *et al.*, *Cancer Res.*, 35:2975-80 (1988); Wang, *et al.*, *J. Immunol.*, 154:4685-92 (1995); Hung *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:9730-35 (1996). El CT26 es un tumor epitelial de colon transplantable inducido mediante la inyección intrarrectal de N-nitroso-N-metiluretano en ratones hembras BALB/c (H-2^d). Corbett *et al.*, *Cancer Res.*, 35:2434-39 (1975).

En los ratones normales, CT26 es poco inmunogénico: 10³-10⁴ células pueden producir un tumor letal sin inducir detectable CTL específica del tumor. Fearon *et al.*, *supra*; Wang *et al.*, *supra*. AH1, un nonámero no mutado derivado de la proteína de envoltorio (gp70) de un provirus de leucemia murina ecotrópico endógeno (MuLV), env-1, se ha identificado como el antígeno inmunodominante MHC de clase I-restringida de las CT26. Huang *et al.*, *supra*. La transferencia adoptiva de líneas celulares CTL péptido específicas ha sido capaz de curar tumores CT26 subcutáneos establecidos, demostrando la correlación entre la inducción de CTL tumor específica y un efecto antitumoral.

Los virus de herpes simplex no crecen en muchas células de rata y los virus atenuados tales como el G207 tampoco crecen bien en muchos tumores de ratón. Esto es contrario a su excelente crecimiento en la mayoría de las líneas tumorales humanas. Sin embargo los estudios en líneas tumorales humanas necesitan la utilización de ratones atímicos. La línea celular CT26 se eligió como modelo después de varios años de intentar encontrar un buen sistema sinérgico, para estudiar de los efectos inmunes de los vectores de herpes atenuados condicionalmente replicados, tales como el G207.

Infección de las células CT26

Se inyectaron subcutáneamente células tumorales (1 x 10⁵) bilateralmente en los flancos de hembras de ratones BALB/c [National Cancer Institute (Rockville, MD)]. Cuando los tumores subcutáneos estaban creciendo, al tacto (aproximadamente de un diámetro de 5 mm), se inocularon los animales unilateralmente en el tumor del lado derecho con virus G207 en 50 μ l de tampón de virus (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5) y medio de Eagle modificado (MEM) (1:1), o con 50 μ l de extracto simuladamente infectado ("simulado"), preparado a partir de células simuladamente infectadas utilizando los mismos procedimientos que se utilizados con el inóculo de virus. En algunos experimentos, siete días más tarde se administró una segunda inyección de la misma composición. El tamaño tumoral se midió mediante un calibre externo. Todos los procedimientos animales fueron aprobados por el Georgetown University Animal Care and Use Committee.

Tal como se muestra en la Figura 1C, la inoculación con G207 produjo una reducción en el crecimiento tumoral tanto de los tumores inoculados (Rt) como de sus compañeros contralaterales no inoculados (Lt) cuando se los comparó a los controles simuladamente inoculados (p < 0,0005 (Rt) y p < 0,001 (Lt) en el día 21 después de la inyección; prueba t no apareada). En el momento de la segunda inoculación, 7 días después de la primera inoculación, se detectó la expresión de lacZ del G207 mediante histoquímica con X-gal, en los tumores inyectados pero no en los tumores no inoculados.

Dos inoculaciones intratumorales con dosis inferiores de G207 [7 x 10³ unidades formadoras de placa (pfu)] indujeron una inhibición del crecimiento significativa de los tumores bilaterales en comparación con los controles (p

$< 0,01$ (Rt) y $p < 0,05$ (Lt) al día 21 después de la infección; prueba t desapareada), pero en menor grado que la dosis superior (ver la Figura 1C).

Una única inoculación intratumoral unilateral con 5×10^7 pfu de G207 produjo una mayor reducción en el crecimiento de los tumores bilaterales (Figura 1A), comparable a la doble inoculación con 7×10^5 pfu (Figura 1C).

El efecto antitumoral en el tumor contralateral no inoculado dependió de la inoculación intratumoral de G207, ya que la inoculación intradérmica de G207 en el flanco derecho de los ratones con tumores unilaterales establecidos en el flanco izquierdo no tuvo efecto sobre el crecimiento de los tumores (ver la Figura 1B).

Función de las células T en la respuesta inmune

Con el fin de valorar la función potencial de las células T en la inhibición del crecimiento tumoral inducido por el virus herpes simplex según la presente invención, se ensayó la eficacia antitumoral de la inoculación intratumoral de G207 en ratones atímicos. La inoculación intratumoral de 7×10^5 pfu de G207 no tuvo efecto. Dosis superiores de G207 (5×10^7) pfu produjeron una ligera inhibición del crecimiento de los tumores inoculados con virus en comparación con los inoculados simuladamente ($p = 0,08$ en el día 10), pero no tuvo efecto en los tumores contralaterales no inoculados. Dicha falta de efectividad en el tumor contralateral en ratones atímicos indica un componente de células T en la respuesta inmune inducida.

Respuesta CTL específica del tumor

Con el fin de determinar si el virus herpes simplex induce una respuesta CTL específica al tumor, se generaron células efectoras *in vitro* a partir de esplenocitos obtenidos el día 12 después de la primera inoculación de virus (G207) y se ensayaron en una prueba de liberación de ^{51}Cr .

Se cultivaron, junto con 1×10^6 células CT26 tratadas con mitomicina C ($100 \mu\text{g/ml}$ de mitomicina C durante 1 hora), suspensiones de células únicas o esplenocitos (3×10^6) de ratones individuales tratados con G207 o con el simulado. Se cosecharon las células efectoras a los 6 días de cultivo *in vitro* y se mezclaron con las células diana en la proporción indicada. Las células diana se incubaron con $50 \mu\text{Ci}$ de $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (^{51}Cr) durante 60 minutos. Se realizaron ensayos de liberación de ^{51}Cr de cuatro horas tal como describen Kojima *et al.*, *Immunity* 1:357-64 (1994). El % de Lisis Específica se calculó a partir de muestras por triplicado como sigue:

$$\frac{\text{cpm experimentales} - \text{cpm espontáneas}}{\text{cpm máximas} - \text{cpm espontáneas}} \times 100$$

La A20 es una línea celular de linfoma de célula B (Ig^+ , Ia^+ , H-2^d) derivada de un neoplasma espontáneo de célula reticular de ratón BALB/c. Kim *et al.*, *J. Immunol.*, 122:549-54 (1979). Es capaz de presentar antígenos de proteína a los linfocitos T reactivos a antígenos restringidos a MHC. Glimcher, *et al.*, *J. Exp. Med.*, 155:445-59 (1982).

Los ratones tratados intratumoralmente con G207 produjeron una respuesta CTL muy específica contra las células CT26 pero no contra las células de linfoma A20 (también H-2^d). No se detectó respuesta CTL específica en los ratones tratados intradérmicamente con G207 o intratumoralmente con extracto simulado. Hubo una respuesta CTL no específica (contra A20 y CT26) inducida en los ratones simuladamente inoculados.

También se valoró la capacidad de los CTL generados en los ratones inoculados intratumoralmente con el virus herpes simplex para reconocer el péptido antigénico inmunodominante MHC de clase I restringida de CT26. AH1, el monómero SPSYVYHQF, es el péptido inmunodominante de CT26, presentado por la molécula de clase MHC I L^d . El péptido AH1 que se une a L^d proviene de gp70, uno de los dos productos del gen env del MuLV endógeno. Huang *et al.*, *supra*, demostraron que las células CT26 expresan el producto del gen env de MuLV mientras que el tejido normal de los ratones BALB/c no lo hace, y que el antígeno vírico, gp70, puede servir como un antígeno de rechazo tumoral potencial para el sistema inmune. El péptido AH1 fue sintetizado por Peptide Technologies (Washington, D.C.) con una pureza $> 99\%$ tal como se determinó mediante HPLC y análisis de aminoácidos.

El H-2L^d restringido P815AB.35-43, LPYLGWLVF, es el péptido inmunodominante proveniente de las células P815 de mastocitoma murino. Van den Eynde *et al.*, *J. Exp. Med.* 173:1373-84 (1991).

Las células efectoras derivadas de los ratones inoculados intratumoralmente con G207 mostraron lisis específica de las células CT26 y de las células A20 pulsadas con el péptido AH1 L^d -restringido, pero no de las células A20 pulsadas con el péptido P815AB L^d restringido. La actividad CTL *in vitro* se suprimió por completo mediante la eliminación de las células CD8^+ , pero no mediante la eliminación de las células CD4^+ .

La inoculación intradérmica con el virus G207 o la inoculación intratumoral con extracto simulado no amplificaron la activación de las células T específicas contra los tumores CT26. Por el contrario, el cebado *in vivo* mediante inoculación intratumoral de G207, contra los tumores que expresaban antígenos endógenos, indujo una respuesta CTL específica contra el péptido antigénico. Estos resultados indicaron que la inoculación de los tumores con virus de herpes simplex puede superar los mecanismos potenciales de tolerancia a la expresión de antígenos endógenos. La

falta de respuesta antitumoral contra los tumores no inoculados en los ratones atímicos y la pérdida de la actividad CTL mediante la eliminación de las células CD8⁺ *in vitro* sugieren una función importante de las células T en el reconocimiento del MHC de clase I restringida por CTL.

5 Ejemplo 2

Eficacia antitumoral de G207 en células M3 de melanoma de ratón

10 Se inocularon células M3 (1×10^5) de melanoma de ratón bilateralmente en los flancos de ratones DBA/2. Cuando los tumores alcanzaron 5 mm de diámetro máximo, el tumor del flanco derecho se inoculó una vez con 5×10^7 pfu de G207 o con una cantidad equivalente de una preparación simulada de células Vero (control negativo).

La inoculación con G207 inhibió el crecimiento de los tumores inoculados ($p < 0,0005$) y también inhibió significativamente el crecimiento de los tumores no inoculados ($p < 0,02$). Figura 2.

15 Ejemplo 3

Eficacia antitumoral de G207 en células N18 de neuroblastoma de ratón

20 *Tumores subcutáneos bilaterales*

Se implantaron subcutáneamente bilateralmente células N18 en ratones singénicos A/J. Ocho días después de la implantación de los tumores, se inyectó en el tumor izquierdo 10^7 pfu de G207 o de simulación. En 6 de los 8 animales, la inoculación con G207 produjo la desaparición de los tumores de los dos lados. Figura 3.

25 *Tumores subcutáneos e intracerebrales*

Se inocularon subcutáneamente bilateralmente células de neuroblastoma N18 en el flanco izquierdo de ratones A/J. Tres días más tarde, se implantaron intracerebralmente células de neuroblastoma N18 en el lóbulo frontal derecho de los ratones. En los días 10 y 13, los tumores subcutáneos solamente, se inyectados con G207 (11 ratones) o con la simulación (11 ratones). A los 35 días de la implantación cerebral todos los ratones tratados con la simulación murieron de, o sufrieron, tumores intracerebrales. Cuatro de los 11 ratones tratados con G207 no tuvieron tumores intracerebrales y uno de los ratones tratados con G207 sobrevivió a largo plazo. El tratamiento con G207 inhibió el crecimiento de los tumores intracerebrales distantes e incrementó la supervivencia de los animales portadores de tumores ($p < 0,05$, mediante el ensayo Wilcox).

Reestimulación con N18

Se inyectaron subcutáneamente con células N18 10 ratones A/J que no habían sido expuestos anteriormente a células N18 (grupo ingenuo), 30 ratones A/J que habían rechazado espontáneamente anteriores inyecciones de células N18 (grupo rechazo) y 12 ratones A/J que anteriormente habían tenido establecidos tumores N18 subcutáneos y se habían curado mediante inyección intratumoral de G207 (grupo curado). Ninguno de los animales del grupo curado mostró signos de crecimiento tumoral, mientras que un gran número de los animales del grupo ingenuo y rechazo mostró un crecimiento tumoral significativo.

45 Ejemplo 4

Eficacia antitumoral de tsK

50 Se implantaron bilateralmente subcutáneamente células de carcinoma de colon CT26 en ratones singénicos BALB/c. Se inocularon en el tumor derecho 10^5 pfu de tsK, un mutante sensible a la temperatura del virus herpes simplex en ICP4, o de un simulado y siete días más tarde (día 7) se les administró una segunda inyección de la misma composición. La inoculación con tsK produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral en los dos tumores ($p < 0,05$ en el día 21). Figura 4.

55 Ejemplo 5

Eficacia antitumoral de un vector defectuoso que contiene IL-12 y virus auxiliar G207

60 Se utilizó la línea de carcinoma colorrectal CT26 para evaluar la eficacia antitumoral de un vector defectuoso que contiene IL-12 y G207 como virus auxiliar.

Generación de vectores defectuosos

65 Se construyeron dos plásmidos de amplicon de tamaños similares, pHCL12-tk y pHCL-tk, que codifican las dos subunidades de la IL-12 murina (p40 y p35) o lacZ, respectivamente, bajo el control del promotor CMV_{IE} (ver las Figuras 5A y 5B). Ya que la IL-12 es funcional como heterodímero, las dos subunidades se expresaron a partir de un único vector defectuoso, como un mensaje bicistrónico, mediante un lugar interno de entrada de ribosomas (IRES).

El plásmido pHCL-tk de amplicon de doble casete se construyó mediante la inserción de del gen de la timidina kinasa (TK) de HSV-1 y fragmento de extremo romo BamH1 del pHSV-106 (Life Sciences Technologies, Inc., Rockville, MD) en el extremo romo del lugar Spe I de pHCL (Figura 5A).

- 5 La región codificante de p40, el fragmento BamH1 de BL-pSV40, el cADN de la p53 de la IL-12 murina y un IRES del virus de la encefalomiocarditis equina (EMCV) de DFG-mIL-12 (IRES-p35) y el fragmento BamH1 de DFG-mIL12 se subclonaron en LITMUS 28 (New England Biolabs, MA) en el lugar BglII/BamH1 con el fin de generar p40-IRES-35. El plásmido de amplicon de doble casete codificante de la IL-12 pHCL12-tk se construyó mediante la inserción del casete p40-IRES-p35, fragmento SmaBI/AflII, en el extremo romo del lugar SalI de pSR-ori y a continuación insertando el fragmento BamH1 de extremo romo de HSV-TK en el lugar SphI con extremo romo con el fin de generar pHCL12-tk. Figura 5B.

- Se utilizó como virus auxiliar el G207, que contiene delecciones en las dos copias del gen γ 34.5 y una inserción en el lacZ de *E. coli* que inactiva el gen ICP6, con el fin de generar almacenes de vector defectuoso (dv). Se cotransfectaron células Vero con el ADN del plásmido de amplicon (pHCL12-tk y pHCL-tk) y con ADN vírico de G207 utilizando lipofectAMINE® (Life Technologies, Inc., Rockville, MD), tal como describe el proveedor, y a continuación se cultivaron a 34,5°C hasta que mostraron un efecto citopático completo. A continuación se cosecharon los virus y se pasaron a una dilución 1:4 en células Vero hasta que se observó la inhibición del virus auxiliar. El vector defectuoso que contiene IL-12 se denomina dvIL12/G207 y el vector defectuoso que contiene el lacZ se denomina dvlacZ/G207.

Titulación de los almacenes de vector defectuoso

- Los almacenes de vector defectuoso se titularon después de un régimen de descongelación/sonicación y eliminación de los restos celulares mediante centrifugación a baja velocidad (2000 x g durante 10 minutos a 4°C). El título del virus auxiliar G207 se expresó como el número de pfu después de un ensayo de placa en con células Vero a 34,5°C. Para dvIL12/G207, se determinó la expresión de IL-12 y se utilizó el pase más elevado (pase 4) con un título de virus auxiliar G207 de 5×10^7 pfu/ml. El título de dvlacZ/G207, determinado mediante el conteo de células X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) histoquímicamente positivas (unidades de partícula defectiva, dpu) después de la formación de placas mediante G207, fue de 5×10^6 dpu/ml y de 5×10^7 pfu/ml de virus auxiliar.

Cultivos celulares

- Las células de riñón de mono verde africano (Vero) se cultivaron en DMEM con 10% de suero bovino (CS). Las células de melanoma de ratón MC-38 Harding-Passey, las de adenocarcinoma de mama humana MDA-MB-435 y las CT26 se cultivaron en DMEM con 10% FCS térmicamente inactivado (Hyclone, Logan UT) y penicilina-estreptomycin (Sigma Chemical Co, St Louis, MO). La línea celular A20, un línea celular de linfoma de célula B (Ig^+ , Ia^+ , $H-2^d$) derivada de un neoplasma espontáneo de célula reticular de ratón BALB/c (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ATCC TIB 208) se cultivó en RPMI 1640 con 10% de FCS térmicamente inactivado, 50 μ M de 2-ME, 2 mM glutamina, 20 mM tampón HEPES y penicilina-estreptomycin.

Detección de IL-12

- La expresión y secreción de IL-12 se determinó mediante ensayo ELISA después de infectar células tumorales en cultivo a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 pfu por célula.

- 24 horas después de la infección, se extrajeron alícuotas del sobrenadante de las células infectadas, se congelaron rápidamente en un baño de hielo seco/etanol y se almacenaron a -80°C con el fin de detectar IL-12. Los tumores y la sangre se recogieron de ratones tratados con vector defectuoso y se congelaron al instante en un baño de hielo seco/etanol. El tejido congelado se homogeneizó en un baño de PBS a la temperatura del hielo con 500 μ M PMSF, 0,5 μ g/ml de leupeptina y 0,7 μ g/ml de pepstatina. A continuación se sonicaron los homogeneizados dos veces durante 10 segundos y se aclararon mediante centrifugación en una microcentrífuga durante 5 minutos a 4°C. Los niveles de IL-12 inmunorreactiva se determinaron mediante ELISA de sándwich, utilizando pares de AS y rIL-12. Los estándares rIL-12 se diluyeron en el mismo medio o tampón que la muestra (es decir, en suero de ratón para las muestras de suero).

- En breve, se incubaron placas de 96 pocillos recubiertas con un mAb anti-IL-12 de ratón (9A5) durante la noche a temperatura ambiente con las muestras que se debían ensayar. Después de múltiples lavados, las placas se incubaron durante 2 horas con el Ab (5C3) anti-p40 de IL-12 de ratón marcado con peroxidasa y a continuación se revelaron. La absorbancia se midió a 450 nm.

- La infección de las células CT26 (carcinoma de colon murino), Harding-Passey (melanoma murino), MCA38 (adenocarcinoma de colon murino) y MDA-MB-435 (adenocarcinoma de mama humano) con dvIL12/G207 produjo la secreción de hasta 1,5 ng de IL-12 murina/ 10^5 células tumorales en 24 horas. Figura 6. No se detectó IL-12 en los sobrenadantes de los cultivos de células tumorales no infectadas o de las infectadas con dvlacZ/G207. Los niveles de síntesis de IL-12 y secreción fueron máximos 1 día después de la infección de CT26 con dvIL12/G207 y disminuyeron a niveles indetectables a los 3 días después de la infección, posiblemente debido a la muerte celular.

Modelo de tumor subcutáneo

Los ratones BALB/c y BALB/c (nu/nu) se obtuvieron del National Cancer Institute o de Charles River (Wilmington, MA). Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Georgetown University Animal Care and Use Committee.

Las células tumorales CT26 (1×10^5) se inyectaron subcutáneamente (s.c.) en los flancos bilaterales de los ratones. Cuando los tumores s.c. crecieron al tacto (aproximadamente 5 mm de diámetro mayor), se inocularon los ratones unilateralmente en el tumor del lado derecho con 50 μ l de vector HSV defectuoso (7×10^5 pfu de virus auxiliar) en tampón de virus (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5) o con 50 μ l de tampón de virus, seguido de una segunda inyección de la misma composición 7 días más tarde. Cuando se indica, se utilizó extracto simulado en lugar de tampón de virus. Como control para la inoculación con dvIL12/G207 se utilizó dvlacZ/G207 en lugar de virus auxiliar G207 solamente de modo que se pudiesen tener en cuenta las diferencias en los factores víricos (es decir, proporción partícula:pfu) presente en los almacenes de vectores defectuosos en comparación con los almacenes de G207. Tanto G207 como dvlacZ contienen lacZ de *E. coli* y por consiguiente el vector defectuoso control no expresó antígenos exógenos adicionales.

El tamaño de los tumores se midió mediante un calibre externo y se calculó el volumen del tumor ($V = h \times w \times d$). Si los animales aparecían moribundos o el diámetro de los tumores s.c. alcanzaba 18 mm, se sacrificaban y se registraban con la fecha de la muerte para los estudios de supervivencia. Las diferencias estadísticas se calcularon utilizando StatView 4.5 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA) en el que el volumen medio de los tumores se valoró mediante la prueba t no apareada, las medias de supervivencia mediante ANOVA (comparación de Fisher *post-hoc*) y las diferencias de supervivencia mediante la prueba Logrank (Matel-Cox).

La inoculación con dvIL12/G207 indujo un efecto antitumoral muy prominente, demostrando, tanto los tumores inoculados como los contralaterales no inoculados, una reducción en el crecimiento tumoral significativa. Figura 7. Dos de 6 de los tumores inoculados con dvIL12 experimentaron un retroceso a un tamaño indetectable. La inoculación con dvlacZ/G207 también produjo una reducción significativa en el crecimiento de los tumores de tanto los tumores inoculados como los no inoculados, en comparación con los controles, aunque en mucho menor grado que la de dvIL12/G207. Figura 7.

También se siguió la supervivencia de los ratones, para lo que el sacrificio tuvo lugar cuando uno cualquiera de los tumores bilaterales alcanzó un diámetro superior a 18 mm. La supervivencia de los animales tratados con los vectores defectuosos refleja por consiguiente el crecimiento de los tumores no inoculados y fue significativamente más larga que la de los animales control. Los ratones tratados unilateralmente con dvIL12/G207 sobrevivieron durante más tiempo que los ratones tratados con dvlacZ/G207 (Figura 8). Se detectó IL-12 en los tumores inoculados con dvIL12/G207 a los días 1 y 5 después de la inoculación (aproximadamente entre 50 y 100 pg/tumor), no se detectó IL-12 en el suero.

Función de las células T en la respuesta inmune

Con el fin de valorar la posible función de las células T en la respuesta antitumoral inducida mediante el vector de HSV defectuoso, se establecieron tumores CT26 s.c. bilaterales en ratones atímicos BALB/c (nu/nu). Tal como en el caso del modelo murino inmunocompetente discutido anteriormente, la inoculación intratumoral bilateral de dvIL12/G207, dvlacZ/G207 o extracto simulado se realizó en los tumores del lado derecho cuando eran palpables (aproximadamente 5 mm de diámetro máximo) y se administró una segunda inyección de la misma composición 7 días más tarde.

Aunque se produjo un ligero retraso en el crecimiento de los tumores del lado derecho inyectados con dvIL12/G207, no se observó una inhibición significativa en el crecimiento de los tumores tanto en los tumores inoculados como en los contralaterales no inoculados. Los tumores CT26 crecieron algo más deprisa en los ratones atímicos que en los ratones inmunocompetentes.

Respuesta CTL tumor específica

Con el fin de determinar si la inhibición del crecimiento tumoral estaba asociado con el incremento en la actividad CTL, se examinó la capacidad de la inoculación intratumoral con vectores HSV defectuosos para inducir una actividad CTL específica de CT26 *in vitro*, utilizando el ensayo de liberación de ^{51}Cr .

Se inocularon ratones BALB/c intratumoralmente con dvIL12/G207 o con dvlacZ/G207 cuando los tumores s.c. alcanzaron aproximadamente un diámetro máximo de 5 mm y se administró una segunda inyección de la misma composición 7 días más tarde. Se cultivaron suspensiones de células sueltas de esplenocitos en medio RPMI 1640 con 10% de FCS inactivado, 50 μ M 2-ME, 2 mM glutamina, 20 mM Hepes y penicilina-estreptomina en placas de 24 pocillos a una concentración de 3×10^6 células/ml. Además, se añadieron al medio 1×10^6 células CT26 inactivadas o 1 μ g/ml de péptido AH1. Con el fin de inactivar, las células tumorales CT26 se incubaron durante 1 hora en medio de cultivo con 100 μ g/ml de mitomicina C y a continuación se lavaron dos veces. Las células efectoras se cosecharon a los 6 días de cultivo *in vitro*.

ES 2 276 470 T3

Los ensayos de 4 horas de liberación de ^{51}Cr se realizaron tal como se describió anteriormente. En breve, las células diana se incubaron con $50\ \mu\text{Ci}$ de $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (^{51}Cr) durante 60 minutos. Las células A20 se pulsaron con $1\ \mu\text{g/ml}$ de péptidos AH1 L^d-restringidos o con P815AB durante 1 hora antes del marcaje. Las células diana se mezclaron a continuación con las células efectoras durante 4 horas a la proporción indicada de E/T. La cantidad de ^{51}Cr liberado se determinó mediante conteo γ y se calculó el porcentaje de lisis específica a partir de muestras triplicadas como sigue:

$$\frac{\text{cpm experimentales} - \text{cpm espontáneas}}{\text{cpm máximas} - \text{cpm espontáneas}} \times 100$$

Las células efectoras de los ratones tratados con dvIL12/G200 reestimuladas con células CT26 tratadas con mitomicina-C mostraron lisis específica de las células CT26 diana y de las células A20 pulsadas con el péptido AH1. No se observó lisis aparente de las células A20 no pulsadas o de las células A20 pulsadas con el péptido L^d-restringido P815AB. Las células efectoras estimuladas con el péptido AH1 de ratones tratados con dvIL12/G207 o con dvlacZ/G207 demostraron lisis específica de las células A20 diana pulsadas con el péptido AH1 y de las células CT26, pero no de las células A20 no pulsadas. El nivel de actividad CTL generado por dvIL12/G207 fue significativamente superior al generado mediante dvlacZ/G207. Las células efectoras de los animales inoculados con dvIL12/G207, no reestimuladas, fueron capaces de inducir específicamente la lisis de las células CT26 pero no la de las células A20.

También se determinó el efecto de la expresión intratumoral de IL-12 sobre la acumulación de tipos particulares de linfocitos T o la producción de IFN- γ . Los esplenocitos se aislaron 5 días después de la segunda inoculación de dvIL12/G207 o de dvlacZ/G207 y se ensayaron para determinar la producción de IFN- γ , mediante ELISA y los subconjuntos de linfocitos T esplénicos, mediante análisis por FACS. En breve, se lavaron suspensiones de células sueltas de esplenocitos y se resuspendieron en RPMI 1640 con 10% FCS inactivado. Las células (3×10^6) se cultivaron en placas de 24 pocillos durante 24 horas. Los sobrenadantes se recogieron y se ensayaron mediante ELISA en sándwich utilizando pares de Ab anti-IFN- γ proporcionados por Endogen (Woburn, MA).

Se encontraron porcentajes semejantes de células T auxiliares (CD4) y células T citotóxicas (CD8a) en los ratones tratados con dvIL12/G207 y dvlacZ/G207. Los esplenocitos de los ratones tratados con dvIL12/G207 produjeron cantidades significativamente superiores de IFN- γ que los tratados con dvlacZ/G207, tal como se muestra a continuación.

Tratamiento	INF- γ (ng/ml)
dvIL12	16 ± 6
dvlacZ	$1,6 \pm 0,6$

Ejemplo 6

Eficacia antitumoral de los vectores que contienen tsK e IL12

Se prepararon vectores defectuosos que contienen IL-12 y tsK o lacZ y tsK. Los plásmidos de vector defectuoso pHCIL12-tk y pHCL-tk se prepararon tal como se describió anteriormente. Los vectores defectuosos se generaron mediante la co-transfección de células Vero con ADN de virus auxiliar tsK y pHCIL12-tk o pHCL-tk. Las células transfectadas se incubaron a $31,5^\circ\text{C}$ (una temperatura permisiva para la replicación de tsK) hasta que se observó un efecto citopático total. A continuación se pasaron las células tal como se describió anteriormente para el virus auxiliar G207. Ver también Kaplitt *et al.*, *Mol. Cell. Neurosci.*, 2:320-30 (1991). El virus defectuoso que contiene IL-12 se refiere como dvIL12/tsK y el vector defectuoso que contiene lacZ se refiere como dvlacZ/tsK.

Se implantaron subcutáneamente bilateralmente células de carcinoma de colon CT26 en ratones singénicos BALB/c, tal como se describió anteriormente. Los tumores derechos se inocularon con dvlacZ/tsK, con dvIL12/tsK o con simulado y se administró una segunda inyección de la misma composición 7 días más tarde. La inoculación con dvlacZ/tsK produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral de los dos tumores ($p < 0,01$ el día 22). La inoculación con dvIL12/tsK produjo una inhibición superior del crecimiento tumoral de los dos tumores, comparado a los tumores inoculados con dvlacZ/tsK ($p < 0,001$). Figura 9.

También se siguió la supervivencia de los ratones inoculados. Los ratones se sacrificaron cuando estuvieron moribundos o cuando sus tumores alcanzaron un diámetro superior a 18 mm. Tal como se observa en la Figura 10, los ratones inoculados con dvlacZ sobrevivieron significativamente por más tiempo que los ratones inoculados con simulado ($p < 0,01$) y los ratones inoculados con dvIL12/tsK sobrevivieron significativamente más tiempo que los ratones inoculados con dvlacZ/tsK o con simulado ($p < 0,01$).

Ejemplo 7

Eficacia antitumoral de un vector que contiene tsK y GMCSF

5 Se implantaron sucutáneamente células de melanoma Harding-Passey bilateralmente en los flancos de ratones C57BL/6. Cuando los tumores alcanzaron un diámetro máximo de 5 mm (día 0), los tumores en el flanco derecho se inyectaron con vector defectuoso dvlacZ/tsK (generado del plásmido de amplicon pHCL-tk que expresa lacZ de *E. coli*) o con dvGMCSF/tsK (generado a partir del plásmido de amplicon pHCGMCSF-tk, cuya estructura es la misma que la del pHCIL12-tk con la excepción de que contiene cADN de GM-CSF en lugar de ADN de IL-12; 10 la expresión de GM-CSF se detectó mediante ELISA) y con virus auxiliar tsK, o con tampón de virus. Los ratones tratados con dvGMCSF/tsK mostraron una supervivencia incrementada sobre la de los ratones tratados con dvlacZ/tsK o con tampón, y mostraron un crecimiento tumoral disminuido en los dos tumores bilaterales.

15 También se debe entender que la descripción, los ejemplos específicos y los datos, mientras describen formas de realización ejemplificativas, se proporcionan a título ilustrativo y no limitativo de la presente invención. A partir de la descripción, la exposición y los datos contenidos en la presente memoria, resultarán evidentes para los expertos en la materia varios cambios y modificaciones en la misma y se considera así que formen parte de la presente invención.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una composición que comprende

un virus de herpes simplex (HSV) que se replica en las células que se dividen y muestra una replicación atenuada en las células que no se dividen y que comprende una o más secuencias de nucleótidos expresables que codifican una o más citocinas o por lo menos un inmunomodulador más y

un vehículo farmacéuticamente aceptable para el virus

con el fin de preparar un medicamento destinado al tratamiento o a la prevención de la metástasis de un tumor de un tipo celular determinado mediante la estimulación de una respuesta inmune antitumoral sistémica en un paciente que presenta o corre el riesgo de desarrollar múltiples tumores metastáticos de un tipo celular determinado

en el que el medicamento es adecuado para inocular el tumor en un paciente.

2. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicha composición induce una respuesta inmune que es específica al tipo celular del tumor y que mata las células del tumor inoculado y las de un tumor no inoculado.

3. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que HSV es incapaz de expresar un producto funcional del gen γ 34.5 y una ribonucleótido reductasa.

4. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el virus es un virus HSV de tipo 1 (HSV1).

5. Utilización según la reivindicación 4, en la que el HSV se ha derivado del mutante multigén G207.

6. Utilización según la reivindicación 4, en la que el HSV se ha derivado del mutante G92A.

7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el virus es un virus HSV de tipo-2 (HSV2).

8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el HSV es condicionalmente competente para la replicación.

9. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el HSV es defectuoso para la replicación.

10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el HSV es un mutante sensible a la temperatura.

11. Utilización según la reivindicación 9, en la que el virus se ha derivado del mutante tsK de ICP4.

12. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el virus es de una cepa de vacuna.

13. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que las células tumorales son de un tipo seleccionado de entre el grupo constituido por astrocitoma, oligodendroglioma, meningioma, neurofibroma, glioblastoma, ependimoma, Schwannoma, neurofibrosarcoma y meduloblastoma.

14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que las células tumorales se seleccionan de entre el grupo constituido por células de melanoma, células de cáncer de páncreas, células de carcinoma de próstata, células de cáncer de cabeza y cuello, células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de colon, células de linfoma, células de cáncer de ovario, células de cáncer renal, neuroblastomas, carcinomas de célula escamosa, meduloblastomas, células de hepatoma y células de mesotelioma y de carcinoma epidermoide.

15. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la citocina se selecciona de entre el grupo constituido por IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, G-CSF, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , preferentemente IL-12 o GM-CSF.

16. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que el inmunomodulador se selecciona de entre los genes que codifican quimioquinas o moléculas coestimuladoras, preferentemente B7.

17. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que el paciente presenta múltiples tumores metastáticos.

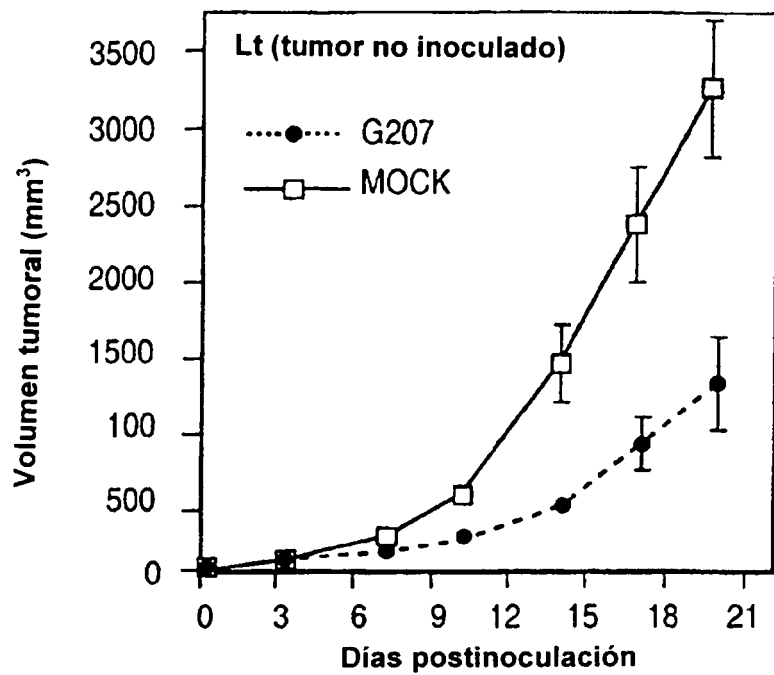


FIG. 1A-1

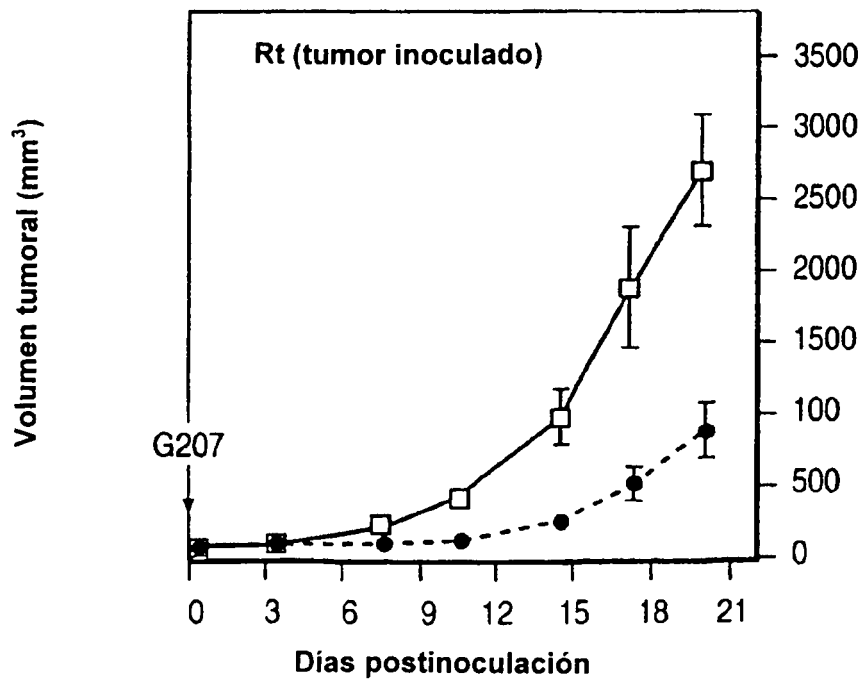


FIG. 1A-2

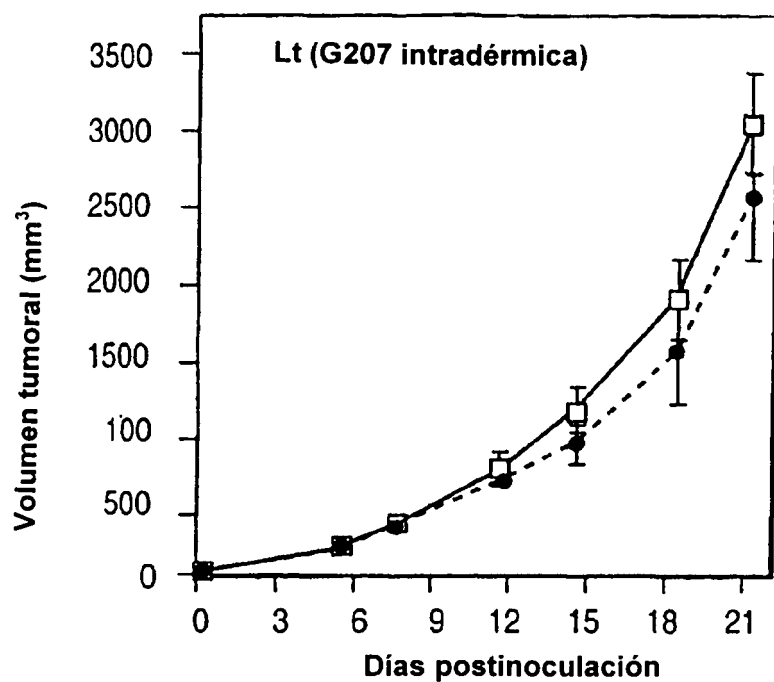


FIG. 1B

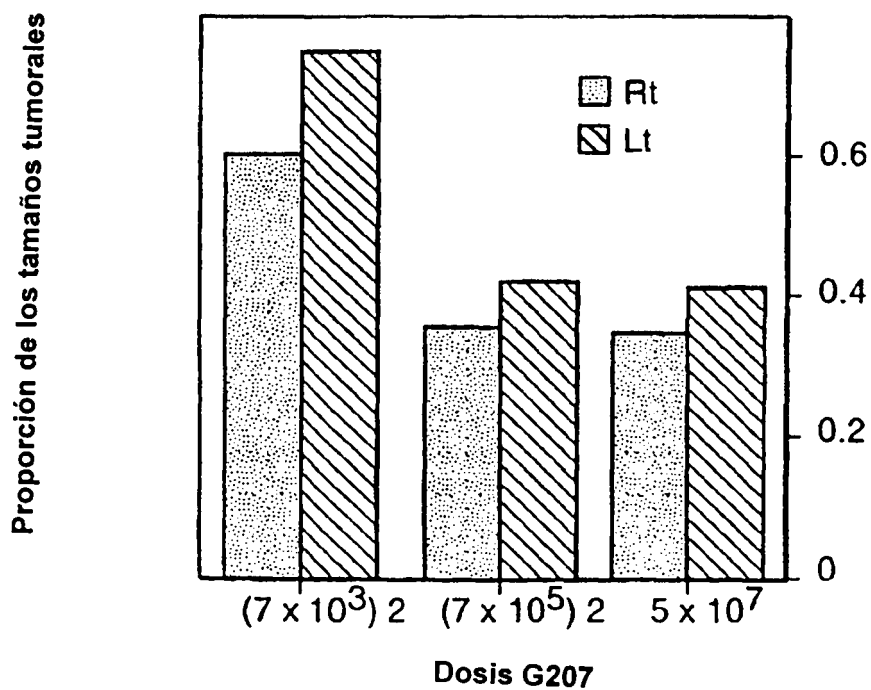
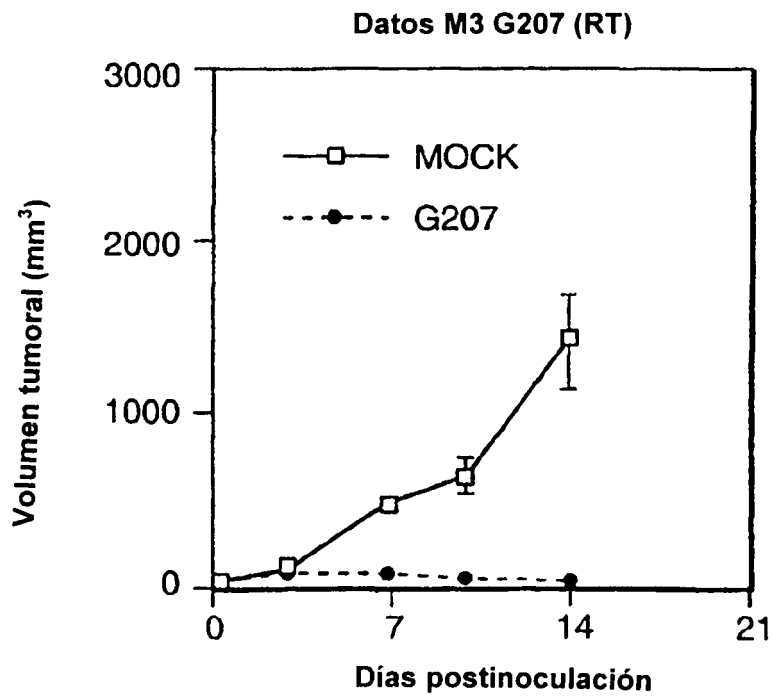
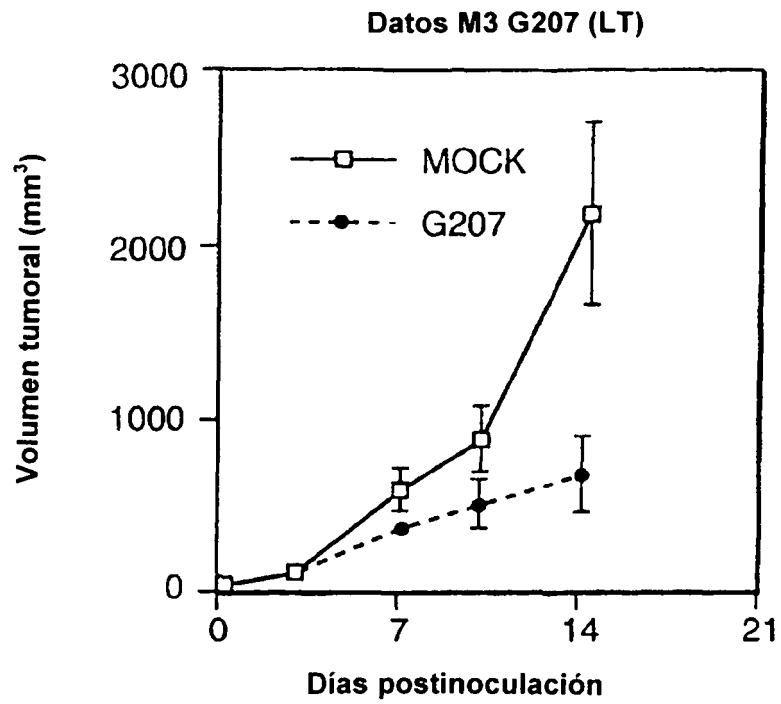


FIG. 1C



Tumor Izquierdo (lado tratado)

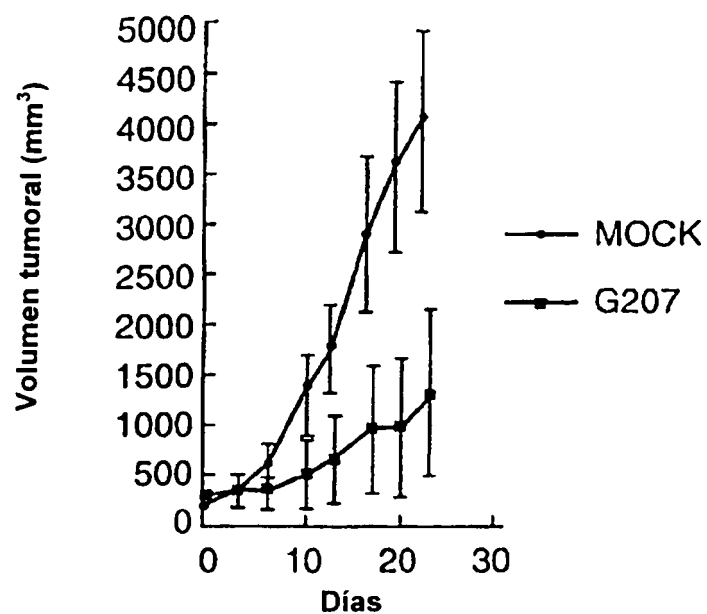


FIG. 3-1

Tumor Derecho (lado contralateral)

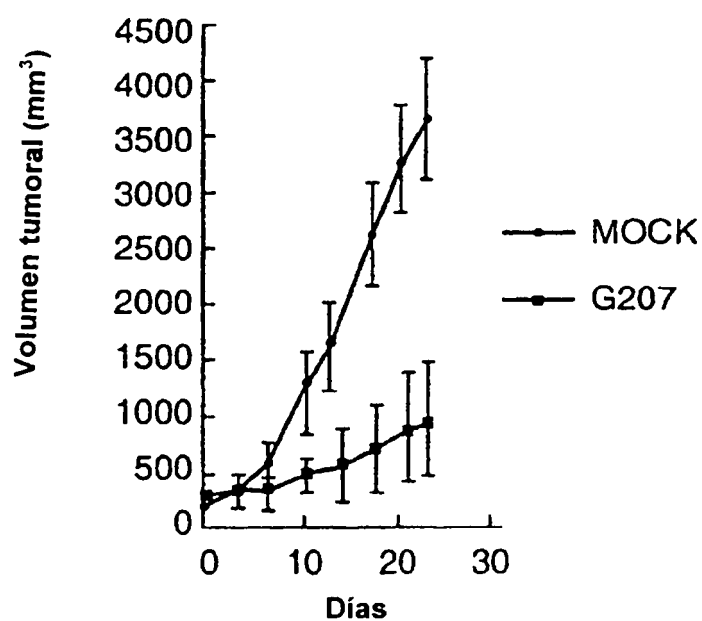


FIG. 3-2

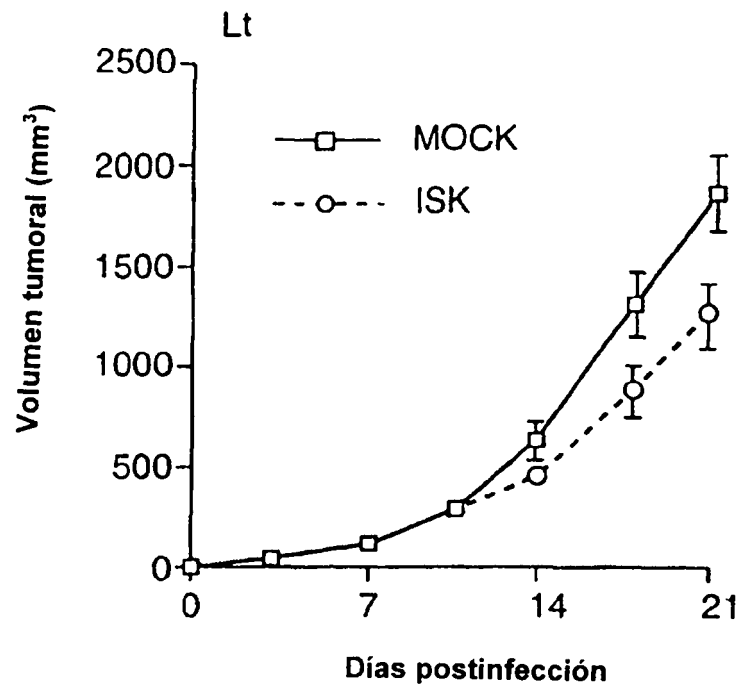


FIG. 4-1

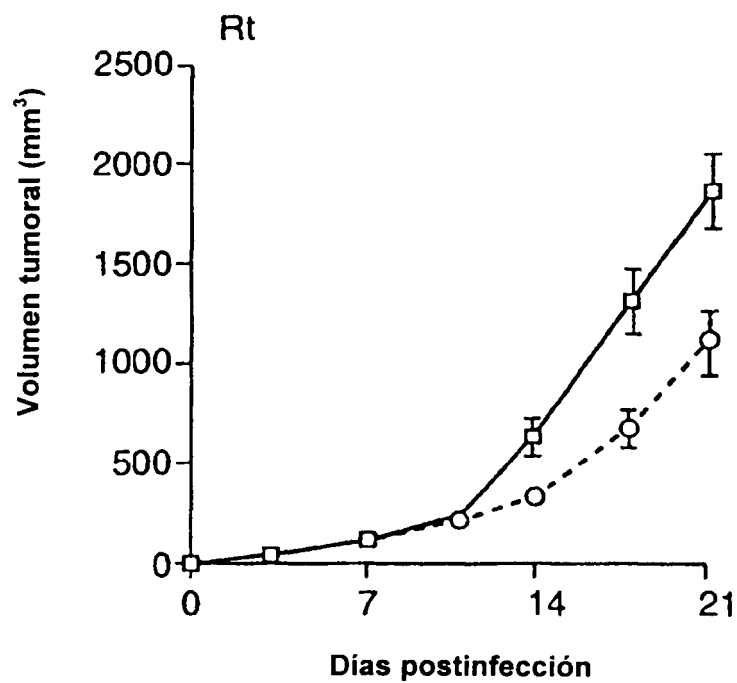


FIG. 4-2

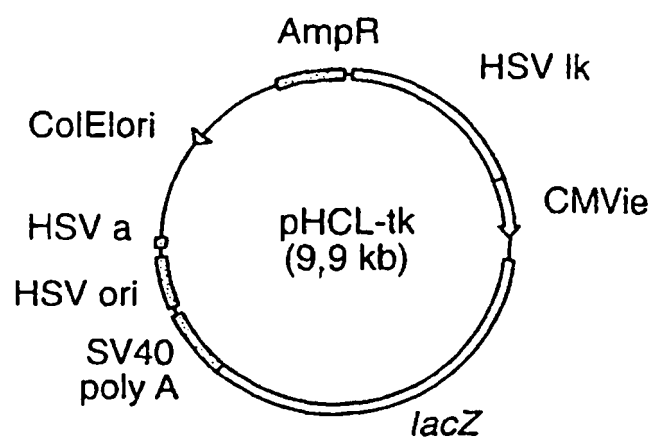


FIG. 5A

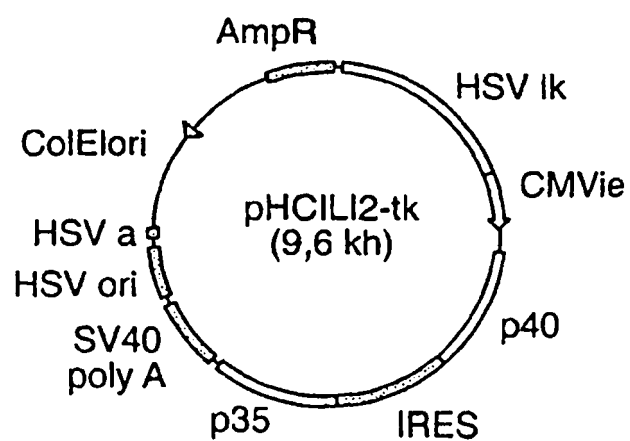


FIG. 5B

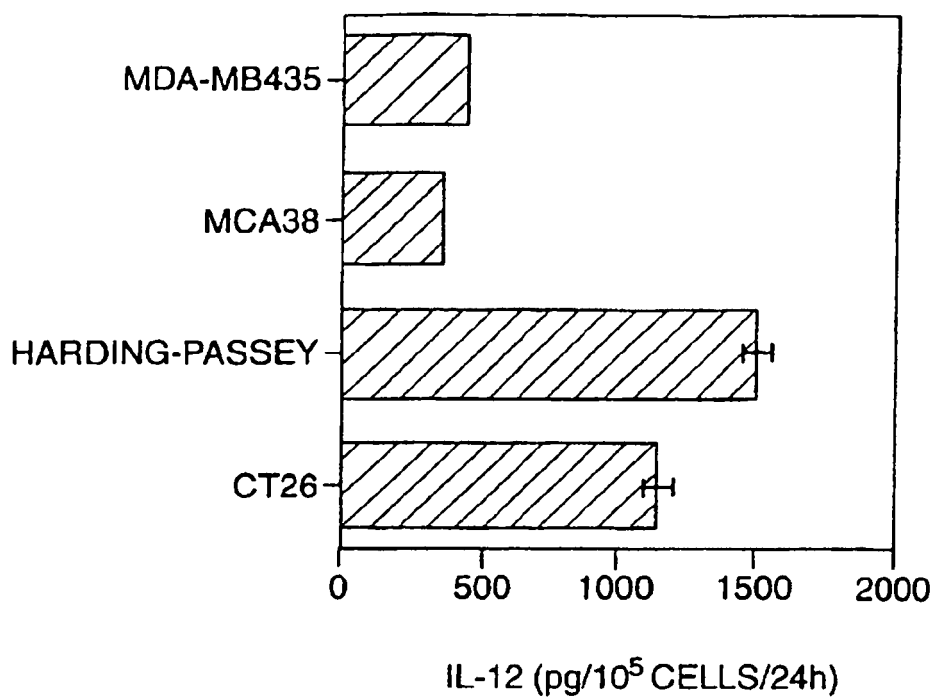


FIG. 6

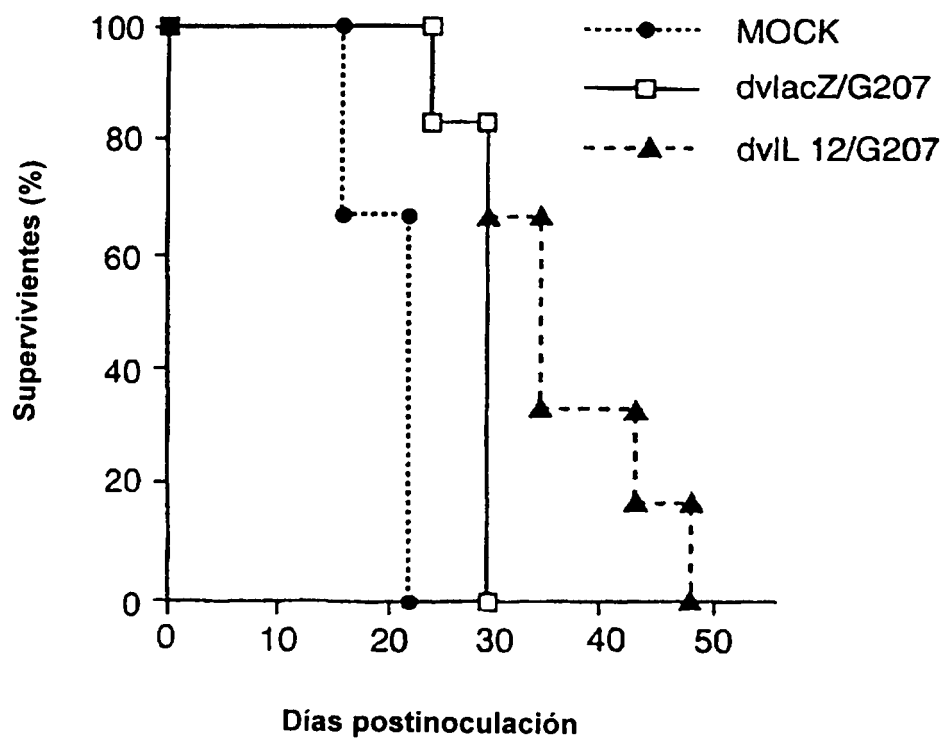


FIG. 8

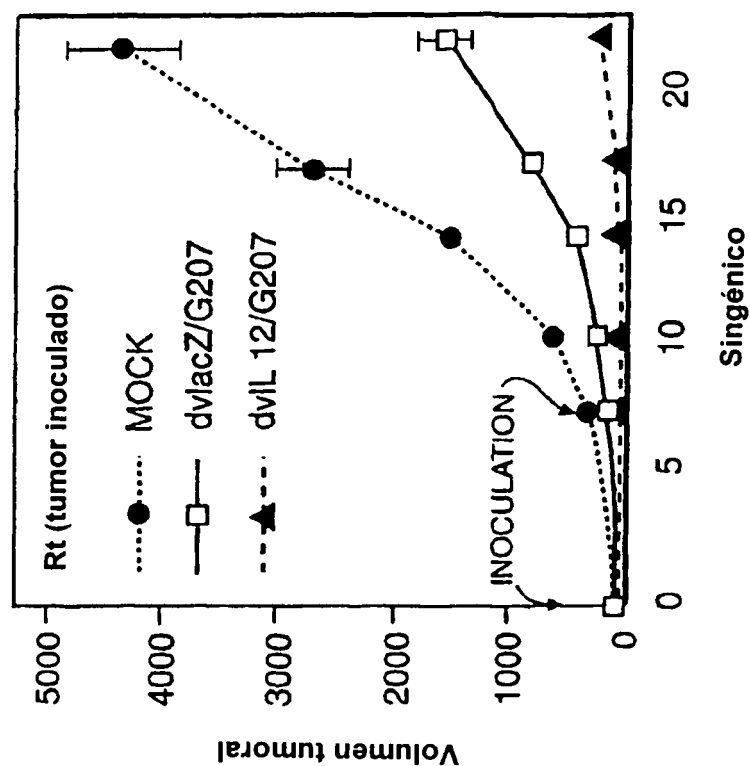


FIG. 7B

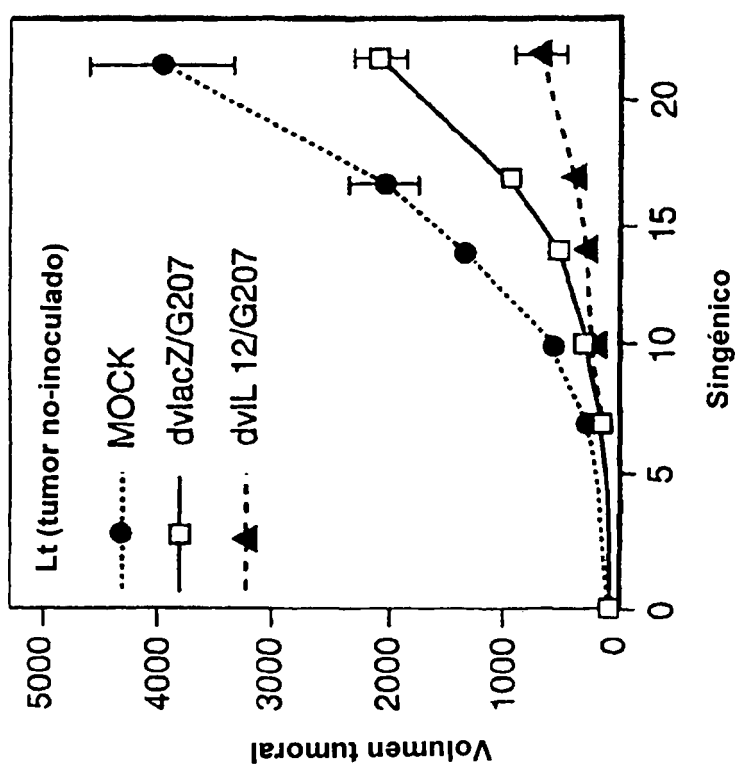


FIG. 7A

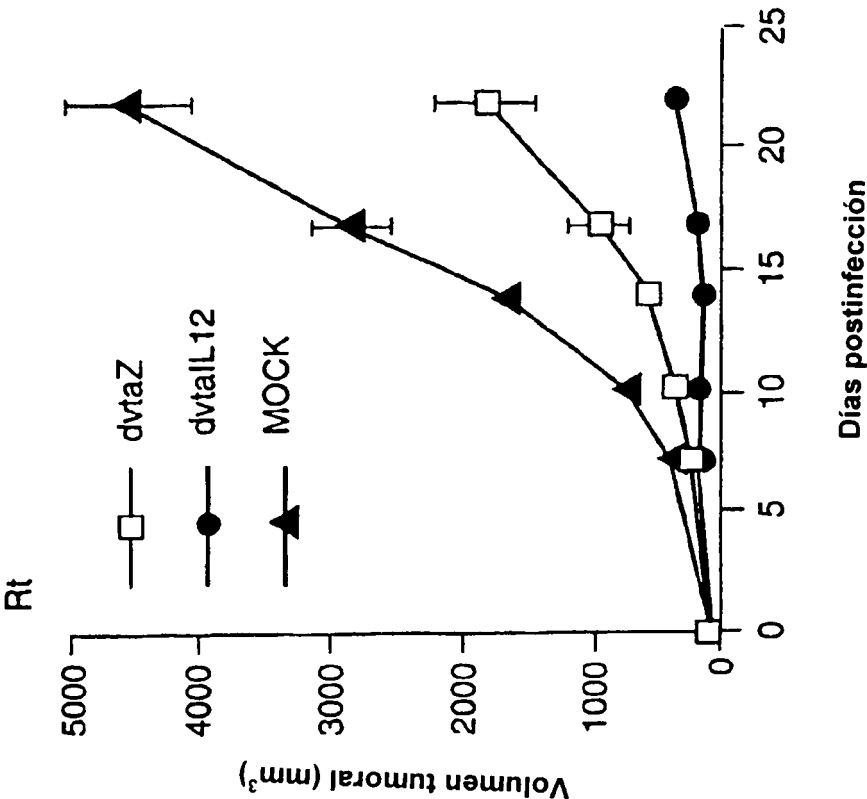


FIG. 9A

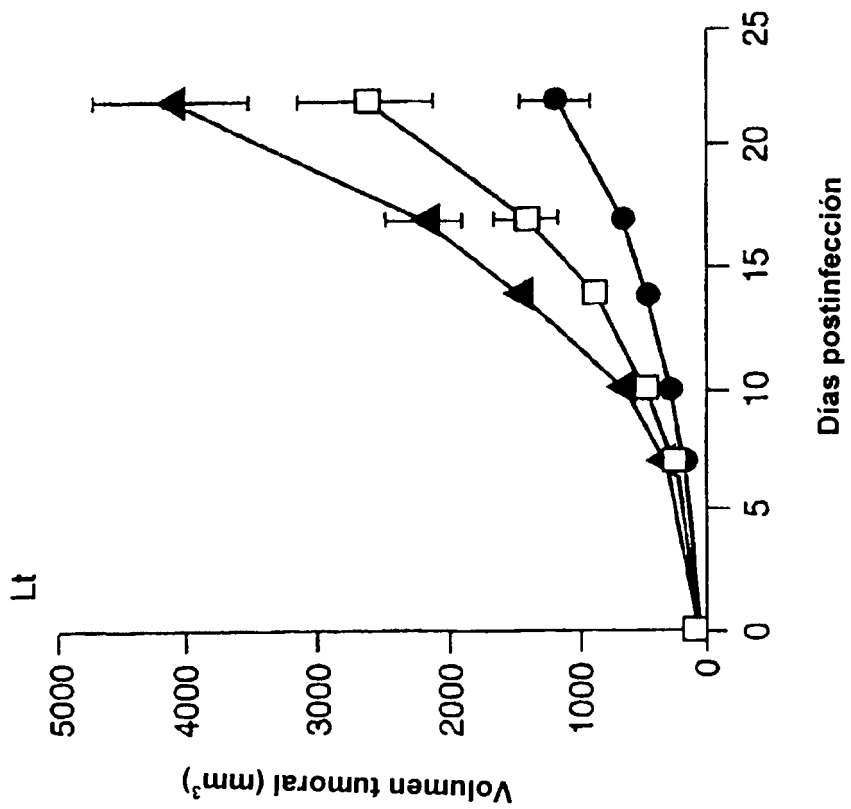


FIG. 9B

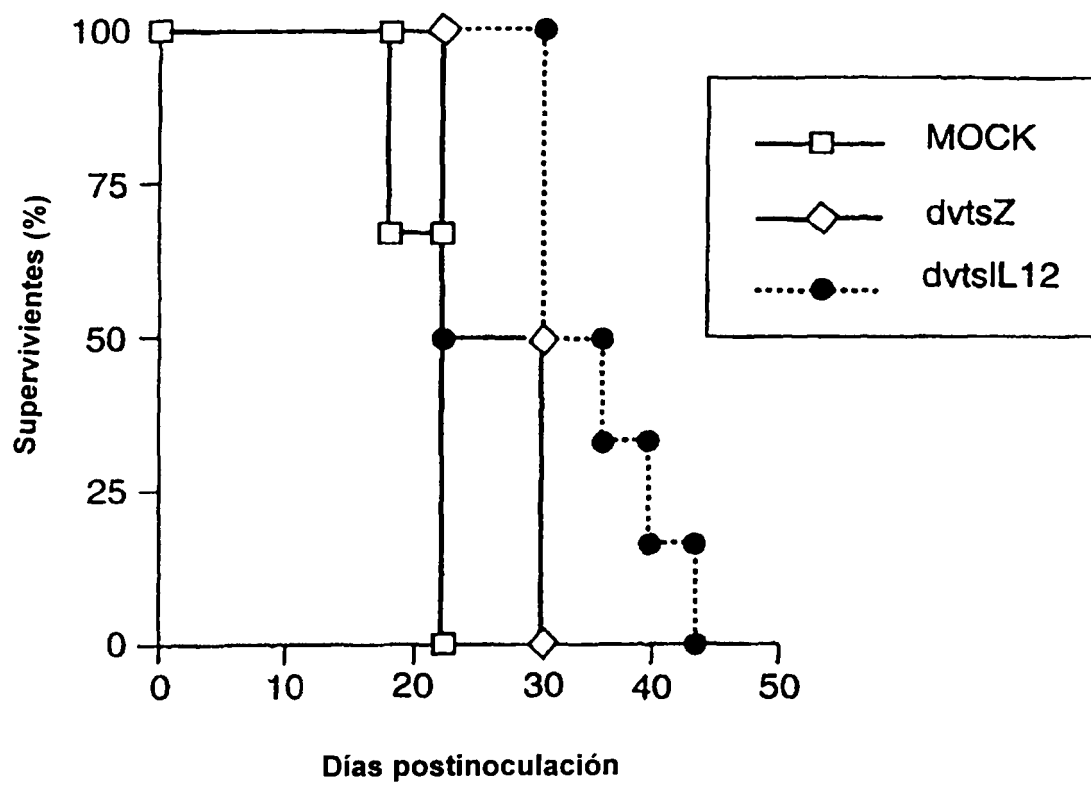


FIG. 10