



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 260 117**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

C12N 15/26 (2006.01)

C07K 14/55 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/74 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 14/535 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01110326 .4**

86 Fecha de presentación : **28.09.1994**

87 Número de publicación de la solicitud: **1156119**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2001**

54

Título: **Terapia génica anticancerosa por modulación de la respuesta inmunitaria y/o inflamatoria.**

30

Prioridad: **29.09.1993 FR 93 11601**

73

Titular/es: **TRANSGENE S.A.**
11, rue de Molsheim
67000 Strasbourg, FR

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2006

72

Inventor/es: **Acres, Bruce**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2006

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 260 117 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia génica anticancerosa por modulación de la respuesta inmunitaria y/o inflamatoria.

5 La presente invención se refiere a la utilización de un vector viral para liberar a nivel de las células tumorales, un gen que codifica para un agente modulador de la respuesta inmunitaria y/o inflamatoria.

10 Generalmente, se admite que el cáncer es una enfermedad que resulta de una pérdida del control de la multiplicación celular. Sus causas pueden ser múltiples y debidas principalmente a un defecto del funcionamiento de genes celulares (activación de genes potencialmente oncogénicos, por ejemplo por mutación (mutaciones) somática(s) de genes normales; desregulación de la expresión de los genes celulares; inhibición de la expresión de genes supresores de tumores) o a la expresión indeseada de genes virales.

15 En el transcurso de los últimos 20 años, se ha demostrado que la mayor parte de las células tumorales presentan en su superficie unos antígenos específicos de tumores (antígenos de no-sentido) que no encuentran sus equivalentes en las células normales. Dichos antígenos tumor-específicos son por ejemplo (i) unos antígenos celulares cuya expresión se mantiene durante el período de feto-embrionario y sufre una regresión en el nacimiento hasta desaparecer, (ii) unos antígenos que se expresan normalmente a un nivel muy bajo y que, expresados a un alto nivel, son característicos de un tumor o (iii) unos antígenos celulares cuya estructura o conformación se han modificado.

20 En principio, la expresión aberrante de estos antígenos tumor-específicos es susceptible de desencadenar una respuesta inmunitaria del mismo tipo que la inducida por cualquier antígeno de no-sentido. Esta expresión pone en funcionamiento el conjunto de células del sistema inmunitario entre ellas los neutrófilos, linfocitos, monocitos y macrófagos.

25 De una forma general, existen dos grandes tipos de respuesta inmunitaria: la respuesta de tipo humoral que corresponde a la producción de anticuerpos mediante los linfocitos B y la respuesta inmunitaria por mediación celular con efecto citotóxico, que hace intervenir células efectoras, esencialmente los linfocitos T citotóxicos (T_c), células NK (por Natural Killer en inglés) y células fagocitarias. Unas células reguladoras modulan los dos tipos de respuestas inmunitarias: esencialmente los linfocitos T auxiliares (T_h por T helper en inglés) y los linfocitos T supresores (T_s).

30 Una respuesta inmunitaria es un fenómeno extremadamente complejo que requiere principalmente la cooperación de diferentes tipos celulares. Dicha cooperación se efectúa por mediación de las citoquinas, que son unas moléculas solubles que intervienen como mediador entre célula y célula.

35 En lo que se refiere a la inmunidad humoral, los linfocitos B son estimulados por los antígenos de no-sentido en su composición nativa. En respuesta a dicha estimulación, los linfocitos B producen los anticuerpos específicos dirigidos contra los antígenos extraños.

40 Los linfocitos T, por el contrario, sólo pueden ser estimulados por los péptidos, producidos por la degradación de los anticuerpos de no-sentido, presentados a la superficie de las células presentadoras de antígenos (CPA) en asociación con antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

45 La activación de los linfocitos T tiene como efecto desencadenar su amplificación y la puesta en marcha de sus funciones; en particular, la destrucción de las células infectadas o tumorales por los linfocitos citotóxicos.

50 Únicamente una clase de antígenos denominada super-antígenos, no se presenta de forma convencional. Efectivamente, los super-antígenos son capaces de unirse a las moléculas del CMH sin haber sido previamente degradados en péptidos y pueden activar simultáneamente una cantidad de linfocitos T superior a la que sería activada por la vía de los antígenos clásicos. Dichos super-antígenos son, por lo tanto, susceptibles de inducir una fuerte respuesta inmunitaria.

55 La inflamación se desencadena mediante la respuesta del organismo contra una agresión, por ejemplo una herida o una infección. La respuesta inflamatoria comprende toda una serie de reacciones, principalmente la liberación de moléculas quimiotácticas o quimioattractivas (igualmente designadas con el término quemoquinas) que van a atraer las células del sistema inmunitario en el lugar mismo de la inflamación.

60 Los linfocitos T activados producen entre otras, unas moléculas inhibitoras de los fenómenos de migración celular, como el MIF (por Migration Inhibition Factor en inglés). Como su nombre indica, el MIF tiene como función inhibir la migración de los macrófagos, y por consiguiente, favorecer su concentración a nivel del lugar de la inflamación para que ejerzan su función de fagocitosis en unas condiciones óptimas.

65 En el caso de un cáncer declarado, la respuesta inmunitaria anti-tumoral resulta deficiente, sea porque el sistema inmunitario por él mismo es deficiente, o bien porque los cambios fenotípicos de las células tumorales inhiben o no son suficientes para desencadenar la respuesta inmunitaria.

ES 2 260 117 T3

Con el fin de tratar los cánceres, ya se ha propuesto anteriormente reforzar la respuesta inmunitaria anti-tumoral con la administración a los pacientes de dosis sistémicas y repetidas de citoquinas tales como la interleuquina-2 (IL-2), el interferón (IFN γ) o el factor de necrosis tumoral (TNF) del tipo α (Rosenberg, 1992, J. Clin. Oncology, 10, 180-199). Desgraciadamente, no se pueden descuidar los efectos secundarios, partiendo de la náusea hasta incluso la muerte. Además, dicho tratamiento resulta extremadamente costoso.

Con el mismo espíritu, se ha propuesto también un método alternativo basado en la transferencia *ex vivo* de un gen que codifica para una molécula inmuno-estimulante en las células de un paciente con fines de expresión. Brevemente, (i) se extraen de un paciente, unas células tumorales o linfocitos que infiltran los tumores (TIL por Tumor Infiltrating Lymphocyte en inglés); (ii) se transfectan *ex vivo* mediante un vector que presenta un gen que codifica para una molécula inmuno-estimulante tal como la IL-2, la IL-4, la IL-6 y el TNF α ; y (iii) se reimplantan en el paciente del que se han extraído.

Como anteriormente, los ensayos clínicos no han dado hasta el momento actual más que resultados modestos, incluso insatisfactorios. Numerosos investigadores dan muestras de una baja expresión (Anderson, 1993, Science, 259, 1391-1392). Además, dicho protocolo es muy difícil de aplicar a gran escala. En efecto, se necesita el cultivo en masa de células por cada enfermo a tratar, con los inconvenientes que esto implica desde el punto de vista de los costes, del tiempo y del riesgo. Además, no se puede garantizar la ausencia de expresión de nuevas variantes de antígenos tumorales durante la fase de cultivo *in vitro*.

Muy recientemente, Plautz *et al* (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 4645-4649) han presentado la transfección directa *in vivo* de las células tumorales de ratones por un retrovirus recombinante. Este último fue modificado con el fin de permitir la expresión de un ADN complementario (ADNc) que codifica para un antígeno de superficie murino del CMH. El antígeno retenido es alogénico, es decir que presenta una variación genética con respecto al ratón huésped, con el propósito de estimular la respuesta inmunitaria contra las células tumorales que expresan dicho antígeno. Si dicho método suprime la necesidad de establecer una línea celular para cada enfermo, sin embargo, solamente es aplicable a los tumores accesibles por cirugía.

Elkins *et al.*, *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 33, página 282 (1992) describe la utilización de un virus de la vacuna que expresa el gen que codifica para la IL-4 murina. Tras la inyección intraperitoneal, la IL-4 se detecta en el fluido peritoneal de los ratones inyectado durante 3 días. Además, la administración de este virus de la vacuna recombinante a nivel del sitio de inoculación de células tumorales provoca una inhibición de la formación de tumores.

Sivanandham *et al.*, *Annals of plastic Surgery*, vol. 28, n° 1 (1992) describe diferentes estudios terapéuticos que utilizan citoquinas o células activadas por estas últimas con fines anti-tumorales. Entre ellas, debe destacarse que la administración de lisados virales preparados a partir del virus de la vacuna que expresa el gen que codifica para la IL-2 va acompañada de una reducción significativa de la carga de metástasis hepáticas derivadas de tumores de colon.

El documento WO 92/20356 describe la utilización de un virus de la vacuna que expresa diversos genes que codifican para antígenos de rechazo de tumores, eventualmente en combinación con genes que codifican para unas moléculas que actúan como modulador de la respuesta inmunitaria tales como unas citoquinas o unos antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad para el tratamiento de cánceres humanos.

Actualmente, se ha encontrado que un virus de la vacuna administrado a un ratón que desarrolla un tumor, infecta preferentemente los tejidos cancerosos. Cuando el virus de la vacuna es portador de un gen que codifica para una molécula inmuno-estimulante, se observa una inhibición del crecimiento de los tumores y en determinados casos una regresión completa.

Es la razón por la que la invención tiene por objeto la utilización de un vector viral derivado de un virus de la vacuna en cuyo genoma se inserta un fragmento de ADN que presenta uno o varios genes que codifican por lo menos para un agente que interviene en la destrucción de las células cancerosas, por ejemplo, un agente tóxico para las células cancerosas o un agente modulador de la respuesta inmunitaria y/o inflamatoria; para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en los mamíferos.

Se han descrito las condiciones generales de obtención de un virus de la vacuna capaz de expresar un gen heterólogo en la patente europea EP 83 286 y en la solicitud EP 206 920. Según una forma ventajosa, dicho fragmento de ADN se insertará en el gen TK del virus de la vacuna, con el fin de inactivar el gen viral y facilitar la selección de los virus recombinantes de la vacuna.

De acuerdo con los objetivos perseguidos por la presente invención, un vector viral puede además comprender un bloque de expresión de un gen marcador de selección con el fin de facilitar las etapas de aislamiento y de purificación del virus recombinante. Se puede citar principalmente el gen *Neo* que confiere la resistencia al antibiótico G418 o el gen TK del virus del herpes simple de tipo 1 (HSV-1) que confiere la sensibilidad a ciertos análogos de nucleósidos tales como el ganciclovir o el aciclovir.

Dicho vector viral puede incluir asimismo un gen distinto a los definidos a continuación que puede actuar de forma cooperativa con el efecto modulador de la reacción inmunitaria y/o inflamatoria buscada. Se tratará ventajosamente de un gen que codifica para todo o para una parte de un antígeno específico de tumores. Se pueden citar más parti-

ES 2 260 117 T3

cularmente las proteínas E6, E7 del virus HPV, principalmente del tipo 16 ó 18 implicadas en los cánceres de útero, la proteína MUC1 y, más particularmente la región repetida de ésta, implicada en los cánceres de pecho y por último el antígeno GA. 733.2 implicado en los cánceres colorrectales. Las secuencias que codifican para dichos antígenos se describen en la técnica anterior. Está al alcance del experto en la materia aislarlos, por ejemplo por la técnica del PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando bases complementarias, insertarlos en el vector viral retenido corriente arriba o corriente abajo del gen modulador y colocarlos bajo el control de los elementos necesarios para su expresión.

Para los fines de la presente invención, un fragmento de ADN que presenta uno o varios genes que codifican para todo o parte de un agente modulador de la respuesta inmunitaria y/o inflamatoria, denominado en lo sucesivo agente modulador, se introduce en un vector viral, vehículo de transferencia y de expresión de dicho(s) gen(es). Los métodos para insertar un fragmento del ADN en un vector viral son conocidos por el experto en la materia.

Por otra parte, el gen que codifica para un agente modulador puede ser del tipo genómico (que presenta todo o una parte del conjunto de los intrones del gen natural), del tipo ADN complementario (ADNc) desprovisto del intrón o del tipo minigen, es decir mixto, que presenta al menos un intrón. Puede codificar para un agente modulador nativo tal como el encontrado en un mamífero, para una parte de éste último, para una molécula quimérica que procede de la fusión de las secuencias de origen diverso o un mutante que presenta las propiedades biológicas mejoradas o modificadas, a condición de que dichas moléculas ejerzan una función inmunomoduladora o moduladora de la respuesta inflamatoria. Dicho mutante puede obtenerse por mutación, delección, sustitución y/o adición de uno o varios nucleótido(s) del gen que codifica para dicho agente modulador. El gen en cuestión puede codificar para (i) una molécula soluble, ya sea intracelular o bien segregada en el medio exterior o (ii) una molécula anclada en la membrana y por lo tanto, presente en la superficie de las células que la expresan.

Los genes que codifican para un agente modulador pueden obtenerse por clonación, por PCR o por síntesis química según las técnicas convencionales comúnmente utilizadas.

Evidentemente, el fragmento de ADN puede comprender los elementos adecuados de regulación de la transcripción así como unas señales de iniciación y de terminación de la traducción que permiten la expresión del o de los gen(es) que codifican para un agente modulador. Entre dichos elementos, la región promotora reviste una importancia particular.

De una forma general, se recurrirá a una región promotora funcional en las células del mamífero que se desea tratar, preferentemente en las células humanas. Puede tratarse de la región promotora que regula naturalmente la expresión de dicho gen o de una región promotora de origen diferente, por ejemplo obtenida de genes eucariotas o virales. Por otra parte, la región promotora se puede modificar para contener unas secuencias reguladoras, por ejemplo un elemento activador de la transcripción (enhancer) o secuencias que responden a determinadas señales celulares.

La región promotora retenida podrá ser constitutiva o regulable, y en éste último caso, regulable en respuesta a ciertas señales celulares, tejido-específicas o suceso-específicas. Resultará ventajoso utilizar una región promotora tejido-específica, cuando el tumor a tratar se obtiene de un tipo celular particular. De forma alternativa, la utilización de un promotor que responde a unas señales específicamente tumorales (por ejemplo, regulable por la presencia de factores de crecimiento generalmente liberados por las células tumorales) puede resultar ventajoso puesto que la expresión se limitará a las células tumorales.

Dichos promotores son generalmente conocidos por el experto en la materia. Se pueden citar principalmente los promotores SV40 (Virus Simian 40), HMG (Hydroxy-Methyl-Glutaryl-coenzyme A), TK (Thymidine Kinase), los LTR (Long Terminal Repeat) del RSV (Rous Sarcoma Virus), del Mo-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus), el MLP (Major Late Promoter) del adenovirus, los promotores 7,5K y H5R del virus de la vacuna, los promotores hígado-específicos de los genes de la α 1-antitripsina, de la albúmina, del factor IX de la coagulación y de la transferrina y los promotores de los genes de las inmunoglobulinas que permiten la expresión de los genes que regulan en los linfocitos. Dichos ejemplos no son limitativos.

En el marco de la presente invención, el fragmento de ADN presenta uno o varios gen(es) que codifican para por lo menos una citoquina que se pueden colocar bajo el control de los elementos que permiten su expresión, de forma independiente o común. En otros términos, el fragmento de ADN podrá contener uno o varios casetes de expresión de uno o varios genes que codifican para por lo menos una citoquina.

Por otra parte, el fragmento de ADN puede incluir asimismo una secuencia señal que permite la secreción de la citoquina en cuestión fuera de la célula. Puede tratarse de la secuencia señal natural del gen que codifica para dicha citoquina o bien de una secuencia señal heteróloga funcional en las células eucariotas, por ejemplo la secuencia señal del gen que codifica para la transferrina o la α 1-antitripsina.

Unas citoquinas ventajosas para los fines de la presente invención, son las producidas por las células del sistema inmunitario, principalmente los linfocitos y los macrófagos o bien sus células madre progenitoras y que intervienen en la activación de las células del sistema inmunitario, el transporte de señales entre las células del sistema inmunitario y la diferenciación celular de las células madre en las células maduras de la circulación sanguínea.

ES 2 260 117 T3

Como citoquinas útiles para los fines de la presente invención, se mencionan principalmente:

(1) Las interleuquinas (IL). En el momento actual, se han identificado 16 interleuquinas. Resulta particularmente difícil atribuirles una función específica porque ejercen efectos pleiotropos. En el marco de la presente invención, todas las interleuquinas presentan un interés, pero se cita más particularmente:

- La IL-1, que se produce por los macrófagos como consecuencia de una estimulación por los compuestos bacterianos. Su función se ejerce a nivel de la activación linfocitaria. La IL-1 es también una molécula pro-inflamatoria y a dicho título induce la producción de quemoquinas.
- La IL-2, que es responsable de la proliferación de los linfocitos T activados, y que, en asociación con el IFN γ , estimula la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Además, ciertos estudios tienden a mostrar que tiene una función quimiotáctica para los linfocitos cuando se produce a nivel de un tumor.
- La IL-4, que se produce por los linfocitos T activados y estimula el crecimiento de los linfocitos B y, en algunos casos, los linfocitos T.
- La IL-5, que favorece la multiplicación y la diferenciación de los leucocitos eosinófilos así como, en una mínima medida, la producción de anticuerpos.
- La IL-6, que se produce por los macrófagos y los linfocitos T. Tiene un efecto pleiotrópico e interviene entre otros como estimulante de la actividad citotóxica de los linfocitos T y de la producción de anticuerpos. Se trata asimismo de una molécula pro-inflamatoria.
- La IL-7, que se produce por las células del estroma de la médula ósea e interviene en la proliferación de los linfocitos pre-B y -T.
- La IL-12, que se produce por los macrófagos activados e induce la producción del IFN γ .

(2) Los interferones (IFN), que presentan unas propiedades antivirales e inmunomoduladoras. Pueden activar las células fagocitarias y aumentar la expresión de los antígenos de superficie de clase I y II del CMH y estimular asimismo la citotoxicidad de las células NK contra las células tumorales. Existen tres clases principales de IFNs, cada una presentando un interés en el marco de la presente invención. Dichas diferentes clases, respectivamente α , β y γ , comprenden cada una numerosos subtipos.

(3) Los factores que estimulan las colonias CSF (por Colony Stimulating Factor en inglés), que intervienen a nivel de la maduración de las células madre hematopoiéticas y su diferenciación en células maduras de la circulación sanguínea. Se distinguen los GM-CSF, G-CSF y M-CSF (por Granulocyte-Macrophage, Granulocyte y Macrophage respectivamente) según el estadio de maduración y el tipo celular sobre el que dichos factores ejercen su influencia.

(4) Los factores de necrosis tumoral (TNF). Se distingue el TNF α producido por los macrófagos y el TNF β producido por los linfocitos T. Ambos son responsables de la actividad citotóxica antitumoral de los macrófagos y linfocitos y de la alteración tisular local observada en la reacción inflamatoria.

(5) Los factores MIF, que inhiben la migración de los macrófagos.

(6) Los fragmentos C5a del complemento, que es un factor quimiotáctico de los macrófagos.

Para los fines de la presente invención, se prefieren particularmente, la IL-2, la IL-4, la IL-5, la IL-6, la IL-7, el IFN γ , el GM-CSF y el TNF β .

El medicamento derivado de la presente invención está destinado al tratamiento de un cáncer en los mamíferos, más particularmente en el hombre. Los cánceres que podrían ser así tratados son, ventajosamente, los tumores sólidos tales como los cánceres de pecho, de pulmón y de colon. Se indica que dicho medicamento debería permitir más particularmente tratar los tumores secundarios que son unas complicaciones frecuentes encontradas en numerosos tipos de cáncer, y para las que actualmente no existe una terapia satisfactoria.

El medicamento derivado de la presente invención se administra por vía parenteral tal como la vía intramuscular o vía intravenosa. De una forma general, la administración puede realizarse en una dosis única o repetida, uno o varias veces después de un determinado intervalo de tiempo.

Según una forma de realización preferida de la invención, el medicamento comprenderá, además de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho vector viral, un soporte aceptable desde un punto de vista farmacéutico. Puede comprender asimismo un vehículo, un diluyente o un adyuvante aceptable desde un punto de vista farmacéutico y presentarse en forma líquida o liofilizada.

La dosificación adecuada varía en función de los diferentes parámetros, por ejemplo de la vía de administración, del individuo a tratar, de la naturaleza y de la gravedad del estado tumoral, del tipo de vector viral utilizado o incluso del gen o genes codificando para el agente modulador. Uno de los criterios que permite evaluar la dosificación adecuada es la medición de la actividad sérica del agente modulador. Dichos ensayos son unos ensayos estándar. En particular, se puede citar el ensayo de bioactividad en la IL-2 (Gillis *et al.*, 1978, J. Immunol., 120, 2027-2032). Sin embargo en general, la dosis de vector viral/kilo será de 10^4 a 10^{11} , ventajosamente de 10^7 a 10^{10} y preferentemente de 10^7 a 10^9 unidades formando unas colonias (upf)/kilo.

La presente invención se ilustra con los ejemplos siguientes, sin por ello limitarse a los mismos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de los virus recombinantes de la vacuna portadores de un gen que codifica para una citoquina

Las construcciones descritas a continuación se realizaron según las técnicas generales de ingeniería genética y de clonación molecular detallados en Maniatis *et al.* (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). El conjunto de las etapas de clonación que utilizan unos plásmidos bacterianos se lleva a cabo pasando por la cepa *Escherichia coli* (*E. Coli*) 5K o XL1-Blue (Stratagène), mientras que las que utilizan unos vectores derivados del fago M13 se realizan en *E. coli* NM522.

En lo que se refiere a las mutagénesis dirigidas por oligodesoxinucleótidos sintéticos, se aplica el protocolo descrito por Zoller y Smith (1982, Nucleic Acids Res., 10, 6487) en el que se utiliza el kit de origen comercial según las recomendaciones del fabricante.

Los fragmentos de ADN que presentan los genes que codifican para el GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-7, se someten a una etapa de mutagénesis dirigida con el fin de introducir los sitios de restricción adecuados con vistas a su inserción en un vector de transferencia, corriente abajo del promotor de 7,5 K del virus de la vacuna. Se utilizan dos vectores de transferencia: pTG186-poli (descrito en la solicitud de patente EP 206 920) y pTG194. Este último difiere del pTG186-poli en la orientación del polilinker.

Más precisamente:

Un fragmento que presenta el ADNc que codifica para el GM-CSF murino tal como se ha descrito en Gough *et al.* (1984, Nature, 309, 763) se somete a una mutagénesis dirigida después de la clonación en M13TG130 (Kieny *et al.*, 1983, Gene, 26, 91), con el fin de crear un sitio *Bam*H1 en posición -17 en relación con el ATG iniciador de la traducción. El fragmento *Bam*H1-*Sal*I aislado del vector resultante es insertado entre los mismos sitios de pTG194.

Un fragmento *Eco*RI-*Bam*HI que presenta el ADNc que codifica para la IL-4 murina tal como se ha descrito en Lee *et al.* (1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2061) se introduce en el vector M13TG130 y después se somete a una mutagénesis dirigida, con el fin de crear un sitio *Bg*III inmediatamente corriente arriba del ATG iniciador de la traducción. El vector tratado de este modo, se digiere por *Eco*RI y *Bg*III y el fragmento correspondiente se introduce entre los mismos sitios de pTG194.

Un fragmento *Eco*RI-*Bam*HI que presenta el ADNc que codifica para la IL-5 murina tal como se ha descrito en Kinashi *et al.* (1986, Nature, 324, 70) se subclona en primer lugar en el vector M13TG130 y después se somete a una mutagénesis dirigida, con el fin de introducir un sitio *Pst*I en posición -10 y un A en posición -3 en relación con el ATG iniciador de la traducción. El vector tratado de este modo, se digiere por *Eco*RI y *Pst*I y el fragmento correspondiente se inserta entre los mismos sitios de pTG186-poli.

Un fragmento *Eco*RI que presenta el ADNc que codifica para la IL-6 murina tal como se ha descrito en Van Snick *et al.* (1988, Eur. J. Immunol., 18, 193) se subclona en el vector M13TG131 (Kieny *et al.*, *supra*) y se somete a una mutagénesis dirigida, con el fin de introducir un sitio *Bam*HI en posición -9 y un A en posición -3 en relación con el ATG iniciador de la traducción. El vector tratado de este modo, se digiere por *Eco*RI y *Bam*HI y el fragmento correspondiente se inserta entre los sitios *Bam*HI y *Eco*RI de pTG194.

Un fragmento *Sst*I-*Hind*III que presenta el ADNc que codifica para la IL-7 murina tal como se ha descrito en Naman *et al.* (1988, Nature, 333, 571) se subclona en el vector M13TG130 y después se somete a una mutagénesis dirigida, con el fin de crear un sitio *Eco*RV en posición -11 y un A en posición -3 en relación con el ATG iniciador de la traducción. Se aísla un fragmento *Eco*RV-*Pst*I del vector obtenido de este modo que se clona entre los sitios *Sma*I y *Pst*I del pTG194.

Con la ayuda de los vectores de transferencia obtenidos de este modo, se producen los virus de la vacuna correspondientes según el método de recombinación homóloga descrito por Kieny *et al.*, (1984, Nature, 312, 163). Los virus recombinantes obtenidos de este modo se denominan VV-GM-CSF, VV-IL-4, etc.

ES 2 260 117 T3

Se han descrito con anterioridad otros virus recombinantes de la vacuna; en particular los que presentan el ADNc que codifica (i) para la IL-2 humana (solicitud de patente EP 206 939), (ii) para la IL-6 humana (Nakagawa *et al.*, 1991, Eur. Cytokine Net., 2, 11-16) y (iii) para el IFN γ humano (solicitud de patente EP 206 920).

5 Ejemplo 2

Tratamiento de ratones Swiss nude portadores de tumores con un virus de la vacuna que presenta el gen que codifica para la IL-6 (VV-IL-6)

10 1. Preparación de los ratones Swiss nude portadores de tumores

La línea celular SW948 (ATCC CCL 237) generada a partir de un tumor humano colorrectal se cultiva en continuo según las recomendaciones del proveedor. Las células que se recogen se tratan con tripsina y después con desoxirribonucleasa (10 μ g/ml) durante 5 min. A continuación, se lavan con PBS (tampón fosfato salino Dulbecco; Sigma, D5652) y se resuspenden en el mismo tampón a la concentración de 10^7 células/100 μ l.

Unos ratones hembras Swiss nude (Iffa Credo, Francia) de 6 a 8 semanas de edad, reciben cada uno 100 μ l de la suspensión celular obtenida de este modo, por vía subcutánea. Siete días más tarde, se seleccionan los ratones portadores de tumores palpables.

20 2. Ensayo

Dichos ratones se dividen en lotes de ocho aproximadamente. Se destinan dos lotes como lotes control: los ratones reciben o bien 10^7 , o bien 10^8 upf de un virus de la vacuna no recombinante, TK-, generado a partir de un vector de transferencia pTG186-poli (VV-186). Los ratones de un tercer lote (lote-control negativo) reciben únicamente 100 μ l de PBS. Por último, los ratones de los otros dos lotes reciben o bien 10^7 , o bien 10^8 upf de VV IL-6 murina obtenida en el ejemplo 1.

Los virus se administran en solución de PBS, por vía intravenosa a nivel de la cola.

Siete días después de las inyecciones, se retiran 3 ratones de cada uno de los lotes, y se sacrifican para analizar el contenido viral de sus sangres, órganos y tumores, tal como se explica a continuación.

Los tumores y diferentes órganos (hígado, bazo, cerebro, etc...) una vez extraídos, se tratan con tripsina y se disgregan mecánicamente hasta obtener una suspensión. La sangre extraída se diluye volumen a volumen en tampón PBS que contiene 20 mM de EDTA.

Las células obtenidas de este modo, se lavan dos veces con PBS, se resuspenden en un medio de cultivo MEM Dulbecco (Modified Eagles Medium; Gibco BRL) que comprende 10% de suero bovino fetal. Se estima el número de células (viables y no viables) por recuento según los métodos clásicos. Después, se efectúan unas diluciones en serie de 10 en 10 en tampón de PBS. Se añade 1 μ l, 10 μ l ó 100 μ l de cada una de las diluciones en unos cultivos de células BHK establecidos en placas de petri de 3 cm de diámetro (Falcon 3001). Las placas se incuban toda la noche a una temperatura de 37°C al 5% de CO $_2$ y se cuentan las colonias de lisis al día siguiente.

En lo que se refiere a los ratones no sacrificados, se registra la evolución del crecimiento de los tumores a lo largo del tiempo, midiendo la longitud, la anchura y la profundidad de los tumores con la ayuda de un pie de rey. El volumen de cada tumor se calcula aplicando la fórmula de elipsoides $\frac{4}{3} \pi r_1 r_2 r_3$, en la que r_1 , r_2 y r_3 representan respectivamente la longitud, la anchura y la profundidad reducidas a la mitad.

50 3. Resultados

Cualquiera que sea el tipo de virus inyectado, se constata que la tasa de infección de las células tumorales resulta muy superior a la de los tejidos sanos.

El crecimiento de los tumores de los ratones que han recibido el VV-IL-6, cualquiera que sea la dosis, resulta inferior en relación con el de los lotes control y del control negativo. Unos ratones presentan una regresión total de los tumores aproximadamente 15 días después de la administración de VV-IL-6.

60 Ejemplo 3

Tratamiento de ratones DBA/2 portadores de tumores con un virus de la vacuna que presenta el gen que codifica para la IL-2 (VV-IL-2)

Se repite el Ejemplo 2 utilizando:

65 (i) el virus de la vacuna que presenta el gen que codifica para la IL-2 humana, tal como se ha descrito en la solicitud de patente EP 206 939;

ES 2 260 117 T3

(ii) la línea celular murina P815 (ATCC TIB 64) derivada de un mastocitoma de ratón DBA/2; y

(iii) unos ratones hembras DBA/2 (Iffa Credo, Francia) de 6 a 8 semanas de edad.

5 Las variantes son las siguientes: se inyectan a los ratones DBA/2 10^5 células P815 en un volumen de $100 \mu\text{l}$. Se inyectan 10^8 upf de virus a los ratones de cada uno de los lotes. Los ratones destinados a los análisis biológicos se retiran de los lotes 3 días después de las inyecciones.

Se observan unos resultados comparables a los que se presentan en el Ejemplo 2.

10

Ejemplo 4

Tratamiento de ratones DBA/2 portadores de tumores con un virus de la vacuna que presenta el gen que codifica para el GM-CSF (VV-GM-CSF)

15

Se repite el ejemplo 3 utilizando 10^8 upf de VV-GM-CSF. Se registra la evolución del crecimiento del tumor a lo largo del tiempo tal como se indica en el Ejemplo 1. Tal como en el anterior, se observa en algunos animales del lote ensayo, una ralentización del crecimiento de los tumores en relación con los lotes control y al control negativo. Tres ratones de 10 presentan una regresión total de los tumores 15 días después de la administración del vector viral.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de un vector viral que se deriva de un virus de la vacuna, en cuyo genoma se inserta un fragmento de ADN que presenta uno o varios genes que codifican para por lo menos una citoquina, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un cáncer en los mamíferos; estando dicho medicamento destinado para ser administrado por vía parenteral y en particular por vía intravenosa o intramuscular.

10 2. Utilización de un vector viral según la reivindicación 1, en la que las citoquinas se seleccionan de entre las interleuquinas, los interferones, los factores que estimulan las colonias (CSF), los factores de necrosis tumoral (TNF), los factores que inhiben la migración de los macrófagos (MIF) y el fragmento C5a del complemento.

15 3. Utilización de un vector viral según la reivindicación 2, en la que las citoquinas se seleccionan de entre las interleuquinas 2, 4, 5, 6 y 7, el interferón gamma, el factor estimulante de las colonias de tipo granulocito-macrófago (GM-CSF) y el factor de necrosis tumoral de tipo β (TNF β).

4. Utilización de un vector viral según una de las reivindicaciones 1 a 3, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un cáncer en los humanos.

20 5. Utilización de un vector viral según una de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un tumor canceroso sólido en los humanos.

6. Utilización de un vector viral según una de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el vector viral es un vector no-integrativo.

25 7. Utilización de un vector viral según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el vector viral es un vector no-replicativo.

30 8. Utilización de un vector viral según una de las reivindicaciones 1 a 7, según la cual el vector viral comprende además un gene que codifica para un antígeno específico de tumor.

35

40

45

50

55

60

65