



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 912**

51 Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 14/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04813611 .3**
96 Fecha de presentación : **10.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1691844**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para el tratamiento de tumores resistentes a interferón.**

30 Prioridad: **10.12.2003 US 528525 P**

73 Titular/es: **CANJI, Inc.**
3525 John Hopkins Court
San Diego, California 92121, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.08.2011

72 Inventor/es: **Benedict, William, F.**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.08.2011

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

ProcedimientoS y composiciones para el tratamiento de tumores resistentes a interferón

Antecedentes de la invención

La terapia con proteína de interferón está bien establecida en el entorno clínico como un tratamiento para una diversidad de cánceres. Dos especies de interferón disponibles en el mercado usadas ampliamente producidas mediante tecnología de ADN recombinante son interferón α -2b recombinante (Intrón A[®], Schering Corporation) e interferón α -2a recombinante (Roferon[®], Hoffman LaRoche, Inc.). El Intrón A está indicado para su uso en el tratamiento de melanoma maligno en combinación con cirugía, Linfoma No Hodgkin folicular agresivo en combinación con quimioterapia con antraciclina, tratamiento intralesional de condiloma acuminado, leucemia de células pilosas y Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA. Roferon está indicado para su uso en el tratamiento de leucemia mielógena crónica positiva al cromosoma Philadelphia (LMC) y Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA.

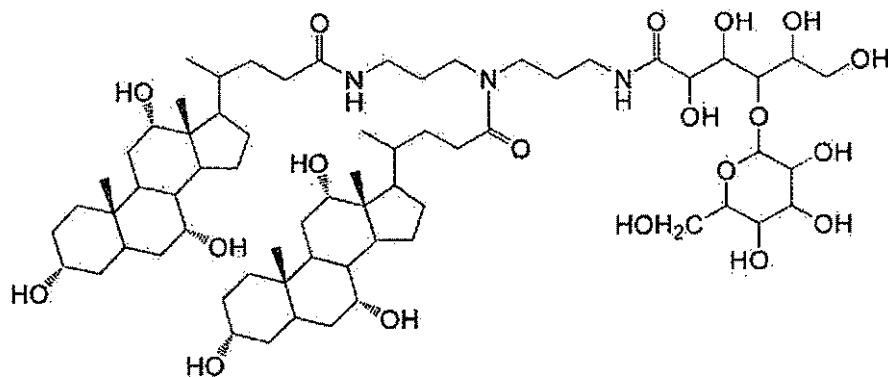
Adicionalmente, los enfoques de investigación para el uso de vectores recombinantes que codifican especies de interferón se han evaluado para determinar efectos antitumorales incluyendo el tratamiento de cánceres del ovario, del riñón y la vejiga, mieloma múltiple, melanoma, determinados linfomas y leucemias y sarcoma de Kaposi. Se han informado actividades antitumorales de adenovirus sin capacidad de replicación que codifican interferón (Ad-IFN α) frente a una diversidad de xenoinjertos tumorales humanos a continuación de inyección directa (Ahmed y col., Cancer Gene Therapy, 8: 788-95 (2001)), que incluían xenoinjertos de carcinoma de células transicionales de vejiga humano (TCC) (Izawa y col., Clin. Cancer Res., 8: 1258-1270 (2002)). Estos estudios muestran que el interferón puede mediar tanto actividad antitumoral directa como un efecto colateral significativo, caracterizado por la activación de células efectoras huésped, apoptosis potenciada y la inhibición de angiogénesis.

Una aplicación particularmente importante en las que se ha evaluado la eficacia de la proteína de interferón recombinante es en el tratamiento de cáncer de vejiga. En los Estados Unidos se diagnostican cánceres de vejiga superficiales en más de 45.000 pacientes/año. La enfermedad se caracteriza típicamente como una malignidad lentamente progresiva que se origina a partir del revestimiento de superficie del urotelio. Aunque la mayoría de estos cánceres superficiales se han tratado de forma adecuada con resección transuretral periódica (TUR) y vigilancia, esto dista mucho de un enfoque óptimo debido a que el 60 al 70 por ciento de tumores superficiales reaparecen después de TUR y hasta el 30 por ciento evoluciona a cánceres más agresivos y potencialmente letales. El índice elevado de reaparición y la imprevisibilidad de los patrones de progresión han conducido al uso extendido de terapia intravesical para el control local de la enfermedad. La inmunoterapia con Bacilo de Calmette-Guerin (BCG) instilado intravesicalmente habitualmente puede retardar la progresión de la enfermedad en pacientes diagnosticados recientemente. Desafortunadamente, esta terapia no produce un cambio cualitativo en la biología subyacente del tumor y muchos pacientes permanecen en riesgo sustancial de un progreso eventual a un cáncer invasivo con peligro para la vida. De hecho, incluso con vigilancia y seguimiento cercano, al menos el 50% de los pacientes eventualmente recaerá y el 30% morirá de cáncer de vejiga metastásico, a pesar de presentar originalmente carcinoma *in situ* "únicamente". Herr y col., J. Urol., 163: 60-61 (2000) y Dalbagni y col., Urol. Clin. North Am., 27: 137-146 (2000). Claramente, son necesarias terapias intravesicales más eficaces para mejorar la supervivencia global y proporcionar una alternativa a la cistectomía radical.

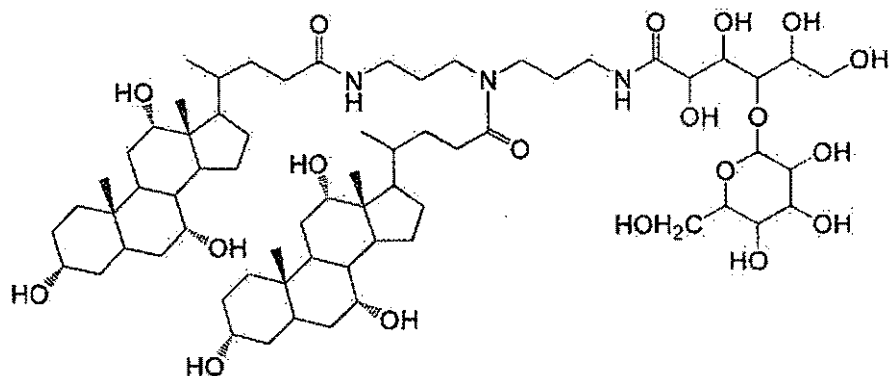
El interferón- α 2b (IFN α 2b) recombinante (Intrón A) intravesical se tolera bien como una monoterapia en pacientes con cáncer de vejiga superficial y es una indicación aprobada para este agente en muchos países. El Intrón A ha demostrado una eficacia clínica relacionada con la dosis como una terapia de rescate en el caso de fallo de BCG, aunque la durabilidad de la respuesta está limitada y la mayoría de los pacientes recaen dentro del primer año de tratamiento. Belldegrun y col., J. Urol., 159(6): 1793-801 (1998). Recientemente, se ha combinado Intrón A con BCG en un intento de potenciar la respuesta inmune celular a BCG y mejorar la respuesta a la terapia. O'Donnell y col., J. Urol., 166: 1300-1304 (2001). La terapia de combinación ha sido eficaz en TCC refractario a BCG, pero muchos de estos pacientes que responden inicialmente recaen con enfermedad superficial y en última instancia necesitan cistectomía.

La terapia génica que emplea vectores recombinantes que codifican especies de interferón proporciona un enfoque prometedor alternativo al tratamiento de cáncer de vejiga superficial refractario. La administración local puede maximizar la expresión génica en el urotelio y minimizar la distribución del vector a órganos vitales fuera de la vejiga. Adicionalmente, la transferencia eficaz de un gen que codifica una proteína secretada (por ejemplo, IFN α 2b) a células tanto normales como malignas del urotelio puede generar un efecto colateral antitumoral potente coincidente con concentraciones de proteína local sostenidas en la orina.

En un primer aspecto de la presente invención se proporciona un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación que codifica un interferón α 2b para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga, en el que el adenovirus se tiene que usar junto con un agente potenciador que tiene la fórmula:

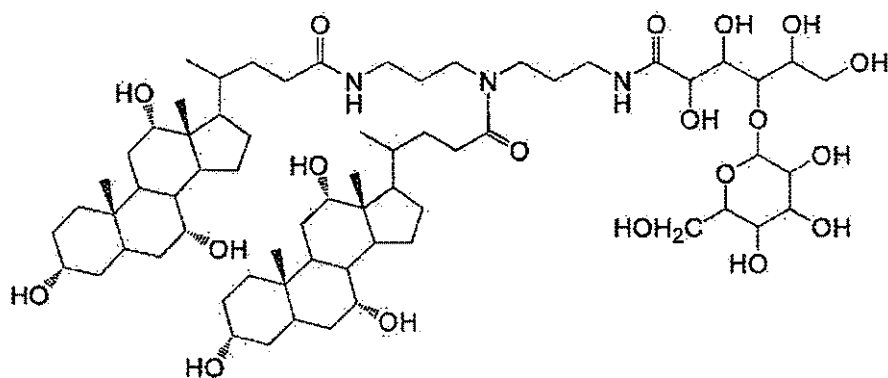


En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un agente potenciador que tiene la fórmula:



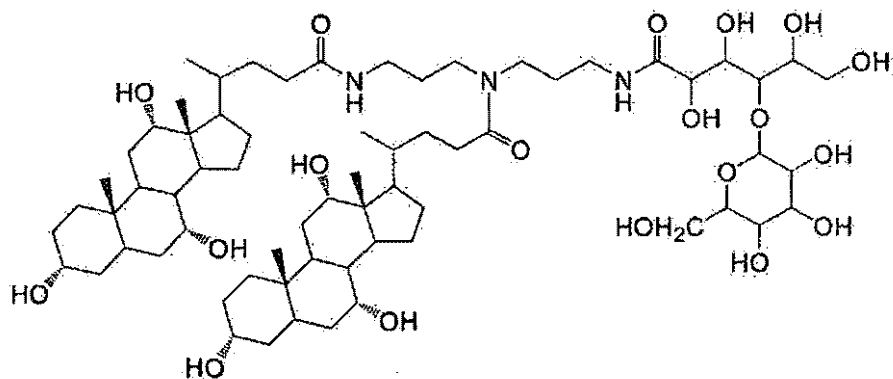
- 5 para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga, en el que el agente potenciador se tiene que usar junto con un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación que codifica interferón $\alpha 2b$.

También se proporciona el uso de un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación que codifica un interferón $\alpha 2b$ para la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga, en el que el medicamento se tiene que usar junto con un agente potenciador que tiene la fórmula:



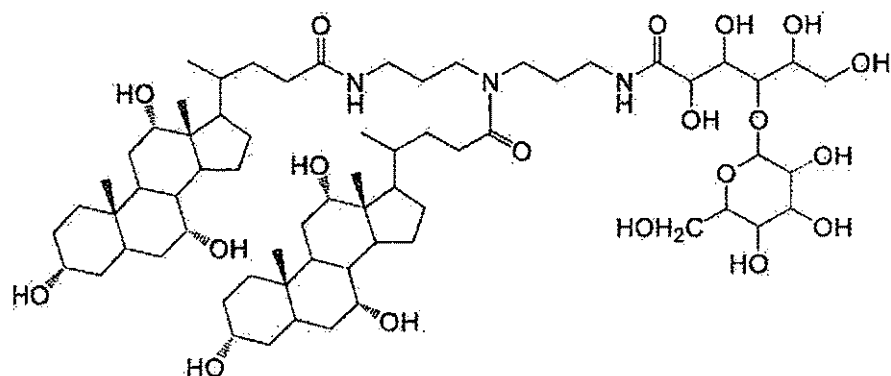
10

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un agente potenciador que tiene la fórmula:



para la preparación de un medicamento para su uso en un tumor resistente a interferón de la vejiga, en el que el medicamento se tiene que usar junto con un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación que codifica un interferón $\alpha 2b$.

- 5 En otro aspecto de la presente invención se proporciona una formulación para instilación intravesical a la vejiga que comprende un agente potenciador o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que tiene la fórmula:



y un vector adenoviral recombinante sin capacidad de replicación que codifica interferón $\alpha 2b$ para su uso en el tratamiento de un tumor de la vejiga resistente a interferón.

10 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 proporciona un dato del efecto de Ad-IFN- $\alpha 2\alpha 1$ /Syn 3 o Ad-IFN- $\alpha 2b$ /Syn3 intravesical sobre la regresión tumoral. El gráfico a la izquierda del panel muestra disminución marcada en el tamaño del tumor antes del tratamiento 21 días después de tratamiento* con Ad-IFN $\alpha 2\alpha 1$ /Syn 3 o Ad-IFN $\alpha 2b$ /Syn3, $P=0,0024$. Todos los otros grupos de tratamiento mostraron crecimiento tumoral progresivo incluyendo Ad-IFN $\alpha 2\alpha 1$ sin Syn3 o la proteína IFN- $\alpha 2\alpha 1$ en solitario. A la derecha hay una serie de microfotografías de fluorescencia que proporcionan un ejemplo representativo de imágenes de tumor antes del tratamiento y aquellas tomadas 21 días más tarde de ratones individuales en cada grupo de tratamiento.

La Figura 2 proporciona una demostración de expresión de IFN prolongada a continuación de tratamiento intravesical de Ad-IFN/Syn3. El Panel A demuestra que se observan niveles sostenidos de IFN en los homogenados de vejiga de ratones atímicos tratados una vez con Ad-IFN $\alpha 2b$ /Syn3 que se aumentó después de dos exposiciones. Por el contrario, tratamiento similar con 200.000 UI de proteína Intrón A no mostró tales niveles elevados o prolongados de IFN. Las flechas indican cuándo se proporcionaron el tratamiento 1 y 2. El Panel B proporciona datos que indican que se observan los mismos niveles elevados de IFN en el urotelio y tumor de vejiga adyacente mediante análisis inmunohistoquímico 2 días después de dos tratamientos con Ad-IFN $\alpha 2\alpha 1$ /Syn 3 en ratones atímicos. Las flechas muestran tinción de IFN perinuclear marcada presente en muchas células. El Panel C demuestra que se observan niveles elevados similares de IFN en el urotelio de ratones Balb-C exogámicos 7 días después de tratamiento con Ad-IFN $\alpha 2\alpha 1$ /Syn 3 o Ad-IFN $\alpha 2b$ /Syn3. No se observaron cambios morfológicos en el urotelio mediante el examen histológico o cortes teñidos con H&E.

La Figura 3 proporciona una comparación de citotoxicidad de AD-IFN a líneas celulares de cáncer de vejiga resistentes a más de 100.000 UI de Intrón A. El Panel A muestra la tinción de IFN negativa en células de control

(Aumento 10X) y tinción de IFN perinuclear marcada en células 253J-BV tratadas con Ad-IFN α 2 α 1 (Aumento 40X). El Panel B son datos de un análisis citométrico de flujo que muestra aumento de células subdiploides 48 h después de tratamiento de una MOI 50 de Ad-IFN α 2 α 1 en células 253J B-V. Las barras rojas indican la población subdiploide. El Panel C ilustra que se observa un aumento en el número de células G2/M a continuación de tratamiento con Ad-IFN α 2 α 1 de más del 60%. El Panel D demuestra la citotoxicidad marcada a Ad-IFN α 2 α observada en las células 253J B-V a la misma MOI 50 de Ad-IFN α 2 α 1. Una MOI 50 de Ad- β gal también se usó para estos estudios como un control y no se observó citotoxicidad, ni se observaron cambios en estas células cuando se trataron con 100.000 UI de Intrón A. Se observaron resultados similares usando células KU7 o usando Ad-IFN- α 2b.

La Figura 4 ilustra muerte celular dependiente de caspasa que se produce en células de cáncer de vejiga resistentes a proteína IFN a continuación de tratamiento con Ad-IFN incluyendo células que no muestran tinción de IFN. El Panel A proporciona células KU7 o 253J-BV tratadas con Ad-IFN- α 2 α 1. Se muestran en paneles superiores imágenes fusionadas de dos en dos canales ópticos de tinción triple de células para IFN (rojo) y ADN (azul) y en paneles inferiores para caspasa-3 activa (verde) y ADN (azul) 36 h después del tratamiento. Se observa activación de caspasa y condensación nuclear en células que expresan IFN (flechas blancas). Sin embargo, la activación de caspasa también se observa en células que no expresan IFN encontradas en las proximidades de células que expresan IFN (flechas amarillas), demostrando un efecto colateral de expresión de IFN en las dos poblaciones celulares diferentes. El Panel B proporciona cuantificación de activación de caspasa 3 en células BV y KU7 72 h después de tratamiento con Ad-IFN a la misma MOI.

La Figura 5 es una comparación de Ad-IFN e Intrón A sobre células de cáncer de vejiga. El Panel A ilustra la producción elevada y sostenida de IFN en el sobrenadante a partir de B-V y KU7 a continuación de tratamiento con Ad-IFN a dos MOI. Los niveles alcanzaron 10 millones pg/ml (~2,5 millones UI de IFN) en ambas líneas celulares. La adición de 400.0000 pg/ml (100.000 UI/ml) de Intrón A al medio de cada línea celular se muestra para comparación y permaneció constante a lo largo de un periodo de 6 días. El Panel B ilustra el porcentaje de células subdiploides mostrado 48 y 72 horas después de la adición de 2,5 millones UI/ml de Intrón A o MOI 50 de Ad-IFN- α 2b. El Panel C ilustra la carencia de cambios morfológicos o tinción de IFN en células KU7 observada después de tratamiento con Intrón A a la misma concentración y puntos de tiempo que el Panel B. Por el contrario, obsérvense las células con tamaño aumentado y tinción perinuclear marcada a continuación de tratamiento con Ad-IFN- α 2b junto con varias células de apariencia apoptótica pequeñas (flechas) (Aumento 40X).

Como se usa en el presente documento, la expresión “tumor resistente a interferón” se refiere a un tumor que es refractario al tratamiento mediante la administración de proteína de interferón de acuerdo con protocolos de tratamiento de interferón convencionales. En el caso de cáncer de vejiga, un tumor se considera refractario a tratamiento con interferón si el tumor no disminuye en un ciclo de terapia de administración intravesical de hasta seis administraciones semanales de aproximadamente 100 millones de unidades de Intrón A durante un tiempo de exposición de aproximadamente 1 hora. En el caso de melanoma maligno, se considera que un tumor es refractario a tratamiento con interferón si el tumor no responde a continuación de un régimen de tratamiento que comprende la administración intravenosa de aproximadamente 201 MUI/m² de Intrón A durante 5 días consecutivos por semana durante 4 semanas (fase de inducción) seguido por una fase de mantenimiento de 3 veces por semana durante hasta 48 semanas a una dosis de aproximadamente 10 MUI/m². En el caso de enfermedades difusas tales como linfomas y leucemias, no existe en general una masa tumoral localizada, sino más bien una enfermedad sistémica caracterizada por leucocitos neoplásicos. Para los fines de la presente invención, las células transformadas de forma neoplásica se deben considerar tumores. En el caso de linfomas foliculares, el tumor se considera refractario a tratamiento con interferón si el individuo no responde a un régimen de tratamiento que comprende administración subcutánea de 5 MUI de Intrón A tres veces por semana durante hasta 18 meses. En el caso de leucemia mielógena crónica positiva a Ph (LMC), el tumor se considera refractario a tratamiento si el individuo no responde a un régimen de tratamiento que consiste en una inyección intramuscular o subcutánea diaria de aproximadamente 9 MUI de Roferon durante un periodo de tratamiento de hasta 5 pero tanto como 18 meses. Como alternativa a la evaluación clínica y respuesta a terapia con proteína de interferón convencional, los tumores se pueden identificar como refractarios a la administración de proteína de interferón según se determine *in vitro* de acuerdo con procedimientos de ensayo *in vitro* convencionales. La caracterización de un tumor como un tumor resistente a interferón se puede determinar mediante exposición de las células tumorales resistentes a interferón que comprenden el tumor que está siendo resistente a la inhibición del crecimiento al contacto con al menos 100.000 unidades de proteína Intrón A según se determine de conformidad sustancial con el ensayo MTT descrito en el Ejemplo 6 en el presente documento.

El término “tumor” se refiere a una colección de células neoplásicas. La expresión “célula neoplásica” se refiere a una célula que presenta un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por independencia de los controles de crecimiento celular normales. Debido a que las células neoplásicas no se replican necesariamente en un punto de tiempo determinado, la expresión células neoplásicas comprende células que se pueden estar replicando activamente o en un estado de reposo de no replicación temporal (G1 o G0). Las poblaciones localizadas de células neoplásicas se denominan neoplasias o tumores (estos términos se consideran intercambiables). Como se ha indicado previamente, el término tumores como se usa en el presente documento también se puede referir a enfermedades neoplásicas difusas tales como leucemia en las que no está presente una masa tumoral localizada sustancial. Las neoplasias o tumores pueden ser malignos o benignos. Los tumores malignos también se denominan

cánceres. En realizaciones preferidas, el tumor es un cáncer epitelial, por ejemplo, mamario, de pulmón, de próstata, colorrectal, de riñón, de estómago, de vejiga o de ovario o cualquier cáncer del tracto gastrointestinal.

Aunque la mayoría de los tumores son de origen generalmente monoclonal, un tumor que se origina a partir de una fuente monoclonal se puede diferenciar con el tiempo. Por consiguiente, un tumor (incluyendo tumores difusos) puede poseer células individuales o subpoblaciones de células que son resistentes a interferón y células o subpoblaciones de células que son sensibles a tratamiento con interferón. La expresión tumores resistentes a interferón se refiere a tumores en los que una población sustancial de las células (es decir, al menos el 20%) que comprenden los tumores son resistentes a interferón determinado de conformidad con el ensayo MTT descrito en el Ejemplo 6.

El término "tratamiento" como se usa en el presente documento, tiene por objeto referirse a la introducción de ácido nucleico que codifica un interferón en un paciente con el fin de exponer un tejido de interés que comprende células neoplásicas al interferón. Por tanto, por ejemplo, un tejido "canceroso" tiene por objeto referirse a un tejido en el que una o más células se clasifican como cancerosas, malignas, tumorales, precancerosas, transformadas o como un adenoma o carcinoma o cualquier otro sinónimo usado comúnmente en la técnica para estas afecciones. Un tratamiento se puede considerar terapéutico si el tratamiento indica una mejora en la condición fisiológica o psicológica del sujeto en el que está presente la neoplasia. La mejora en la condición se puede medir mediante una diversidad de medios incluyendo carga tumoral reducida, reducción de progresión tumoral, ralentización de progresión tumoral, supervivencia aumentada, regresión tumoral, alivio de síntomas asociados con carga tumoral incluyendo pero sin limitación fatiga, anorexia, dolor, depresión, neutropenia y disfunción cognitiva.

Como se usa en el presente documento, el término "interferón" (abreviado "IFN") se refiere colectivamente a interferones de tipo 1 y de tipo 2 incluyendo variantes de supresión, inserción o sustitución de los mismos, fragmentos biológicamente activos y formas alélicas. Como se usa en el presente documento, el término interferón (abreviado "IFN") se refiere colectivamente a interferones de tipo 1 y de tipo 2. El interferón de tipo 1 incluye interferones α , β y ω y sus subtipos. El interferón α humano tiene al menos 14 subtipos identificados mientras que el interferón β tiene tres subtipos identificados. Particularmente, los interferón alfa preferidos incluyen subtipos de interferón alfa humano incluyendo, pero sin limitación, α -1 (Número de Referencia de GenBank NP 076918), α -1b (Número de Referencia de GenBank AAL35223), α -2; α -2a (Número de Referencia de GenBank NP000596), α -2b (Número de Referencia de GenBank AAP20099), α -4 ((Número de Referencia de GenBank NP066546), α -4b (Número de Referencia de GenBank CAA26701), α -5 (Número de Referencia de GenBank NP 002160 y CAA26702), α -6 (Número de Referencia de GenBank CAA26704), α -7 (Números de Referencia de GenBank NP 066401 y CAA 26706), α -8 (Números de Referencia de GenBank NP002161 y GAA 26903), α -10 (Número de Referencia de GenBank NP 002162), α -13 (Números de Referencia de GenBank NP 00h831 y BAA 53538), α -14 (Números de Referencia de GenBank NP 002133 y CAA 26705), α -16 (Números de Referencia de GenBank NP 002164 y CAA 26703), α -17 (Número de Referencia de GenBank NP 067091), α -21 (Números de Referencia de GenBank P01568 y NP002166) e interferones de consenso descritos por Stabinsky, Patente de los Estados Unidos N° 5.541.293, expedida el 30 de julio de 1996, Stabinsky, Patente de los Estados Unidos N° 4.897.471, expedida el 30 de enero de 1990 y Stabinsky, Patente de los Estados Unidos N° 4.695.629, expedida el 22 de septiembre de 1987 e interferones híbridos como se describen por Goeddel y col., Patente de los Estados Unidos N° 4.414.150, expedida el 8 de noviembre de 1983, incorporada por referencia. Los interferones de tipo 2 se denominan interferón γ (documentos EP 77.670A y EP 146.354A) y subtipos. El interferón gamma humano tiene al menos 5 subtipos identificados, incluyendo interferón omega 1 (Número de Referencia de GenBank NP 002168). La construcción de secuencias de ADN que codifican interferones para expresión se puede conseguir mediante técnicas de ADN recombinante convencionales basadas en las secuencias de aminoácido bien conocidas a las que se ha hecho referencia anteriormente y como se ha descrito por Goeddel y col., Patente de los Estados Unidos N° 6.482.613, expedida el 19 de noviembre de 2004.

Se han identificado fragmentos de interferones "biológicamente activos" que tienen cualquier actividad antitumoral o antiproliferativa medida mediante técnicas bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Openakker y col., mencionado anteriormente; Mossman, J. Immunol. Methods, 65: 55 (1983) y activan genes sensibles a IFN a través de mecanismos mediados por receptor de IFN. Las proteínas IFN- α e IFN- β solubles generalmente se identifican como que se asocian con el complejo de receptor de IFN de Tipo 1 (Número de Referencia de GenBank NP 000865) y activan rutas de señalización intracelular y similares. IFN- γ generalmente se identifica como que se asocia con el receptor de IFN de tipo II. La asociación inducida por ligando de ambos tipos de receptores de IFN da como resultado la fosforilación de los receptores mediante quinasas de Janus activando posteriormente proteínas STAT (transductores de señal y activadores de transcripción) y acontecimientos de fosforilación adicionales que conducen a la formación de factores de transcripción inducibles por IFN que se unen a elementos de respuesta de IFN presentados en genes inducibles por IFN. Los polipéptidos identificados como que activan las rutas de IFN a continuación de asociación con receptores de IFN de Tipo 1 y/o de Tipo 2 se consideran interferones con los fines de la presente invención.

La expresión "vector recombinante" se refiere a vectores virales y no virales que comprenden un casete de expresión de interferón que se ha preparado usando tecnología de ADN recombinante convencional. La expresión "casete de expresión de interferón" se usa en el presente documento para definir una secuencia de nucleótidos que contiene

elementos reguladores unidos operativamente a la secuencia que codifica el interferón de forma de dar como resultado la transcripción y traducción de un interferón en una célula. La expresión "elemento regulador" se refiere a promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación y similares. El casete de expresión también puede contener otras secuencias que ayudan a la expresión y/o secreción del gen de interferón.

Los elementos reguladores se pueden disponer de forma de permitir, potenciar o facilitar la expresión del interferón únicamente en un tipo de célula particular. Por ejemplo, el casete de expresión se puede diseñar de forma que el interferón esté bajo el control de un promotor inducible, un promotor específico de tejido o específico de tumor o un promotor temporal. En general el interferón se proporciona en un vector de expresión que comprende los siguientes elementos enlazados secuencialmente a distancias apropiadas para expresión funcional: un promotor, un sitio de inicio de la transcripción, una región no traducida 3', una secuencia líder de ARN 5', una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interferón y una señal de poliadenilación.

La expresión "unido operativamente" se refiere a un enlace de elementos polinucleotídicos en una relación funcional. Una secuencia de ácido nucleico está "unida operativamente" cuando la misma se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si el mismo influye sobre la transcripción de la secuencia codificante. Unido operativamente significa que las secuencias de nucleótidos que están unidas son normalmente contiguas. Sin embargo, como los potenciadores funcionan generalmente cuando se separan del promotor mediante varias kilobases y las secuencias intrónicas pueden ser de longitudes variables, algunos elementos polinucleotídicos pueden estar unidos operativamente, pero no flanqueados directamente e incluso pueden funcionar *in trans* a partir de un alelo o cromosoma diferente.

La expresión "promotor inducible" se refiere a promotores que facilitan la transcripción del transgén de interferón preferentemente (o únicamente) en ciertas condiciones y/o como respuesta a estímulos químicos externos o de otro tipo. Los ejemplos de promotores inducibles se conocen en la bibliografía científica (véase, por ejemplo, Yoshida y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 230: 426-430 (1997); Iida y col., *J. Virol.*, 70(9): 6054-6059 (1996); Hwang y col., *J. Virol.*, 71(9): 7128-7131 (1997); Lee y col., *Mol. Cell. Biol.*, 17(9): 5097-5105 (1997); y Dreher y col., *J. Biol. Chem.*, 272(46): 29364-29371 (1997). Los ejemplos de promotores inducibles por radiación incluyen el promotor EGR-1. Boothman y col., volumen 138, páginas de suplemento S68-S71 (1994).

Los promotores específicos de tejido y específicos de tumor se conocen bien en la técnica e incluyen promotores activos preferentemente en músculo liso (promotor de α actina), específicos de páncreas (Palmiter y col., *Cell*, 50: 435 (1987)), específicos de hígado (Rovet y col., *J. Biol. Chem.*, 267: 20765 (1992); Lemaigre y col., *J. Biol. Chem.*, 268: 19896 (1993); Nitsch y col., *Mol. Cell. Biol.*, 13: 4494 (1993)), específicos de estómago (Kovarik y col., *J. Biol. Chem.*, 268: 9917 (1993)), específicos de pituitaria (Rhodes y col., *Genes Dev.*, 7: 913 (1993)), específicos de próstata (Henderson y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.698.443, expedida el 16 de diciembre de 1997), etc.

La expresión "promotores temporales" se refiere a promotores que activan la transcripción del transgén de interferón en un punto posterior al ciclo viral con relación al promotor que controla la expresión del elemento de respuesta y se usan junto con sistemas de vector viral. Los ejemplos de tales promotores regulados temporalmente incluyen el promotor tardío principal de adenovirus (MLP) y otros promotores tardíos. Para virus de herpes simple, un ejemplo de promotor temporal incluye los promotores activados latentes.

La expresión "vector no viral" se refiere a unas moléculas de ADN de replicación autónoma extracromosomales circulares, diferentes del genoma normal y no esenciales para la supervivencia de la célula en condiciones no selectivas capaces de lograr la expresión de una secuencia codificante de interferón en la célula diana. Los plásmidos se replican de forma autónoma en bacterias para facilitar la producción bacteriana, pero no es necesario que tales plásmidos que contienen la secuencia codificante de interferón se repliquen en la célula diana con el fin de conseguir el efecto terapéutico. Se pueden incluir genes adicionales, tales como aquellos que codifican resistencia a fármaco, para permitir la selección o el reconocimiento de la presencia del vector recombinante. Tales genes adicionales pueden incluir, por ejemplo, genes que codifican resistencia a neomicina, resistencia a multifármaco, timidina quinasa, β -galactosidasa, dihidrofolato reductasa (DHFT) y cloramfenicol acetil transferasa.

Con el fin de facilitar la administración del gen de interferón a un tejido u órgano particular, puede ser provechoso incorporar elementos en el sistema de administración no viral que faciliten la dirección celular. Por ejemplo, un plásmido de expresión encapsulado en lípido puede incorporar ligandos de receptor celular de superficie modificada para facilitar la dirección. Aunque se puede administrar una formulación de liposoma sencilla, los liposomas llenos o decorados con una composición deseada de la invención se pueden administrar por vía sistémica o se pueden dirigir a un tejido de interés, donde los liposomas después administran las composiciones peptídicas terapéuticas/inmunogénicas seleccionadas. Los ejemplos de tales ligandos incluyen anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena única, anticuerpos quiméricos o fragmentos funcionales (Fv, Fab, Fab') de los mismos. Como alternativa, se pueden enlazar vectores no virales a través de un resto de polilisina a un resto de dirección como se ha descrito por Wu y col. Patente de los Estados Unidos Nº 5.166.320, expedida el 24 de noviembre de 1992 y Wu y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.635.383, expedida el 3 de junio de 1997, los contenidos de las cuales se incorporan por referencia en el presente documento.

Los términos "vector viral" y "virus" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquiera de

los parásitos intracelulares obligados que no tienen mecanismo de síntesis de proteína o de generación de energía. El genoma viral puede ser ARN o ADN contenido con una estructura revestida de proteína de una membrana lipídica. Los términos virus y vector o vectores virales se usan indistintamente en el presente documento. Los virus útiles en la práctica de la presente invención incluyen virus de ADN y ARN envueltos o no envueltos modificados de forma recombinante, preferentemente seleccionados entre baculoviridae, parvoviridae, picornoviridae, herpesviridae, poxviridae, o adenoviridae. Los virus pueden ser virus de origen natural o sus genomas virales se pueden modificar mediante técnicas de ADN recombinante para incluir expresión de transgenes exógenos y se pueden modificar por ingeniería genética para ser sin capacidad de replicación, de replicación condicional o con capacidad de replicación. Los vectores virales quiméricos que utilizan elementos provechosos de cada una de las propiedades de los vector parentales (véase, por ejemplo, Feng, y col., *Nature Biotechnology*, 15: 866-870 (1997)) también pueden ser útiles en la práctica de la presente invención. Los sistemas de vector mínimos en los que la estructura viral contiene únicamente las secuencias necesarias para empaquetamiento del vector viral y pueden incluir opcionalmente un casete de expresión de transgén también se pueden producir de acuerdo con la práctica de la presente invención. Aunque generalmente se prefiere emplear un virus de las especies que se tienen que tratar, en algunos casos, puede ser provechoso usar vectores obtenidos a partir de especies diferentes que poseen características patogénicas favorables. Por ejemplo, los vectores del herpes equino para terapia génica humana se describen en la Publicación Internacional PCT N° WO98/27216, publicada el 5 de agosto de 1998. Los vectores se describen como útiles para el tratamiento de seres humanos y el virus equino no es patógeno para seres humanos. De forma similar, se pueden usar vectores adenovirales ovinos en terapia génica humana ya que se indica que los mismos evitan los anticuerpos frente a los vectores adenovirales humanos. Tales vectores se describen en la Publicación Internacional PCT N° WO 97/06826, publicada el 10 de abril de 1997.

La expresión "sin capacidad de replicación" se refiere a vectores que están altamente atenuados para la replicación en una célula de mamífero de tipo silvestre. Para producir tales vectores en cantidad, generalmente se crea una línea de células productoras mediante cotransfección con un virus auxiliar o se modifican genómicamente para complementar las funciones faltantes. Por ejemplo, se han modificado por ingeniería genética células HEK293 para complementar las supresiones de E1 adenoviral que permiten la propagación de los vectores adenovirales sin capacidad de replicación con E1 suprimido en células 293. La expresión "vectores virales con capacidad de replicación" se refiere a un vector viral que es capaz de infección, replicación de ADN, empaquetamiento y lisis de una célula infectada. La expresión "vectores virales con replicación condicional" se usa en el presente documento para referirse a vectores con capacidad de replicación que se diseñan para conseguir expresión selectiva en tipos de células particulares. Tal replicación condicional se puede conseguir uniéndolos operativamente, secuencias de control reguladoras específicas de tejido, específicas de tumor o específicas de tipo celular u otras inducidas selectivamente a genes tempranos (por ejemplo, el gen E1 de vectores adenovirales).

La especificidad de tipo celular o la dirección de tipo celular también se pueden conseguir en vectores virales obtenidos a partir de virus que tienen infectividades característicamente amplias mediante la modificación de las proteínas de envuelta virales. Por ejemplo, la dirección celular se ha conseguido con vectores de adenovirus mediante modificación selectiva de la protuberancia del genoma viral y secuencias codificantes de fibra para conseguir la expresión de dominios de protuberancia y de fibra modificados que tienen interacción específica con receptores de superficie celular únicos. Los ejemplos de tales modificaciones se describen por Wickham y col., *J. Virol.*, 71(11): 8221-8229 (1997) (incorporation of RGD peptides into adenoviral fiber proteins); Arnberg y col., *Virology*, 227: 239-244 (1997) (modification of adenoviral fiber genes to achieve tropism to the eye and genital tract); Harris y col., *TIG*, 12(10): 400-405 (1996); Stevenson y col., *J. Virol.*, 71(6): 4782-4790 (1997); Michael y col., *Gene Therapy*, 2: 660-668 (1995) (incorporation of gastrin releasing peptide fragment into adenovirus fiber protein); y Ohno y col., *Nature Biotechnology*, 15: 763-767 (1997) (incorporation of Protein A-IgG binding domain into Sindbis virus). Otros procedimientos de dirección específica de células se han conseguido mediante la conjugación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo a las proteínas de envuelta (véase, por ejemplo, Michael y col., *J. Biol. Chem.*, 268: 6866-6869 (1993), Watkins y col., *Gene Therapy*, 4: 1004-1012 (1997); Douglas y col., *Nature Biotechnology*, 14: 1574-1578 (1996). Como alternativa, se pueden conjugar restos particulares a la superficie viral para conseguir la dirección (véase, por ejemplo, Nilson y col., *Gene Therapy*, 3:280-286 (1996) (conjugation of EGF to retroviral proteins). La dirección de vectores también se puede conseguir de acuerdo con los contenidos de Murphy, Patente de los Estados Unidos N° 6.635.476, expedida el 21 de octubre de 2003, cuyos contenidos se incorporan por referencia en el presente documento. Estas modificaciones de dirección se pueden introducir en los vectores virales de la presente invención además de o en combinación con otras modificaciones al genoma viral. Las modificaciones de dirección se pueden usar con virus sin capacidad de replicación, con capacidad de replicación o que se replican de forma condicional.

Como alternativa, la dirección por tipo de célula con vectores virales se puede conseguir a través del uso de un promotor sensible a ruta que activa un represor de la replicación viral. La expresión "promotor sensible a ruta" se refiere a secuencias de ADN que se unen a una proteína determinada y provocan que los genes próximos respondan de forma transcripcional a la unión de la proteína en células normales. Tales promotores se pueden generar incorporando elementos de respuesta que son secuencias a las cuales se unen factores de transcripción. Tales respuestas generalmente son inductivas, aunque existen varios casos en los que el aumento de los niveles de proteína disminuye la transcripción. Los promotores sensibles a ruta pueden ser de origen natural o sintético. Los promotores sensibles a ruta típicamente se construyen con referencia a la ruta de una proteína funcional a la que se

dirige. Por ejemplo, un promotor sensible a ruta de origen natural p53 incluiría elementos de control transcripcional activados por la presencia de p53 funcional tal como el promotor p21 o bax. Como alternativa, los promotores sintéticos que contienen sitios de unión a p53 cadena arriba de un promotor mínimo (por ejemplo, la región de caja TATA de SV40) se pueden emplear para crear un promotor sensible a ruta sintético. Los promotores sensibles a ruta sintéticos generalmente se construyen a partir de una o más copias de una secuencia que coincide con un motivo de unión de consenso. Tales motivos de unión a ADN de consenso se pueden determinar fácilmente. Tales secuencias de consenso generalmente se disponen como una repetición directa o de cabeza a cola separada por algunos pares de bases. Los elementos que incluyen repeticiones de cabeza a cola se denominan palíndromos o repeticiones invertidas y aquellos con repeticiones de cola a cola se denominan repeticiones evertidas.

En la práctica preferida de la invención, el vector viral es un adenovirus. El término "adenovirus" es sinónimo del término "vector adenoviral" y se refiere a virus del género adenoviridae. El término adenoviridae se refiere colectivamente a adenovirus animales del género mastadenovirus que incluyen pero sin limitación adenovirus de subgénero humano, bovino, ovino, equino, canino, porcino, murino y de simio. En particular, los adenovirus humanos incluyen los subgéneros A-F así como los serotipos individuales de los mismos los serotipos individuales y subgéneros A-F incluyendo pero sin limitación adenovirus humano de tipos 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 (Ad11A y Ad 11P), 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 19a, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 34a, 35, 35p, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 y 91. El término adenovirus bovino incluye, pero sin limitación, adenovirus bovino de tipo 1, 2, 3, 4, 7 y 10. El término adenovirus canino incluye, pero sin limitación los tipos 1 (cepas CLL, Glaxo, RI261, Utrecht, Toronto 26-61) y 2 canino. El término adenovirus equinos incluye, pero sin limitación, tipos 1 y 2 equino. El término adenovirus porcino incluye, pero sin limitación, tipos 3 y 4 porcino. El término vector viral incluye vectores virales sin capacidad de replicación, con capacidad de replicación y de replicación condicional.

Más preferidos son los vectores obtenidos a partir de adenovirus humanos de tipos 2 y 5. Estos vectores pueden incorporar modificaciones particulares para potenciar su potencial terapéutico. Por ejemplo, los mismos pueden incluir supresiones de los genes E1a y E1b. Se pueden potenciar o suprimir determinadas regiones diferentes para proporcionar características específicas. Por ejemplo, la regulación positiva de la región E3 se describe que reduce la inmunogenicidad asociada con vectores adenovirales humanos administrados a sujetos humanos. La región E4 ha estado implicada como importante para la expresión de transgenes a partir del promotor CMV, sin embargo la proteína E4orf6 se ha descrito como que conduce a la degradación de p53 en células diana en presencia de proteína grande de E1b. Steegenga y col., Oncogene, 16: 345-347 (1998). Por consiguiente, se prefiere la eliminación de tales secuencias de vectores adenovirales.

En una realización de la invención cuando se usan vectores con capacidad de replicación para administrar el gen de interferón, se prefiere emplear un vector adenoviral que contenga supresiones específicas en la región E1a de forma de reducir la capacidad del producto génico de E1a de unirse a las proteínas p300 y Rb mientras que conserva la función transactivadora del dominio E1a CR3. Los vectores de la presente invención contienen supresiones en la secuencia codificante de E1a para eliminar sitios de unión a p300 y p105-Rb en la secuencia codificante 13S. En una realización preferida de la invención las supresiones de unión a p300 están representadas por supresiones de aminoácidos desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 25 o desde aproximadamente 36 hasta aproximadamente 49. En una realización preferida de la invención, las supresiones de unión a Rb se representan mediante la eliminación de aminoácidos desde aproximadamente 111-127, preferentemente desde aproximadamente 111-123. Más preferido es un vector en el que la supresión en el dominio de unión a E1a-p300 comprende una supresión de los codones para los aminoácidos 4 a 25 del producto génico de E1Aa adenoviral. Más preferido es un vector en el que la supresión en el dominio de unión E1a-Rb comprende una supresión de los codones para los aminoácidos 111-123 del producto génico de E1a adenoviral. Como alternativa, la unión a pRb se puede eliminar mediante la introducción de una mutación para eliminar los aminoácidos 124-127 de las proteínas 289R y 243R de E1A. En la realización más preferida de la presente invención como se ha ilustrado en el presente documento el vector comprende una supresión de los aminoácidos 4-25 y 111-123 del producto génico 13S de E1a.

Adicionalmente, la eliminación de aminoácidos desde aproximadamente 219 hasta 289 de la proteína 289R de E1a y 173 a 243 de la proteína 243R de E1a se pueden introducir. Por ejemplo, mediante la introducción de una mutación puntual en la posición correspondiente a la posición 1131 del genoma Ad5 humano (es decir, cambiar la citosina¹¹³¹ a una guanina) crea un codón de parada. Esta mutación da como resultado la eliminación de los aminoácidos 219 a 289 de la proteína 289R de E1a y 173 a 243 de la proteína 243R de E1a. Esta mutación se realiza opcionalmente además de las supresiones en la unión a Rb y p300 descritas anteriormente.

La práctica de la presente invención implica poner en contacto el tumor con un vector recombinante que codifica interferón. El contacto de la célula tumoral se consigue mediante la exposición de las células tumorales con el vector recombinante de forma que las células del tumor se transducen mediante el vector que expresa el interferón codificado por el vector. Los medios particulares mediante los cuales el vector contacta al tumor diferirán dependiendo de la naturaleza del tumor al que se esté administrando el vector. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente en un tejido mediante inyección o en un vaso sanguíneo que irriga el tejido de interés. En realizaciones adicionales de la invención en las que se prefiere la administración local, pero es difícil obtener acceso físico al sitio del tumor, las composiciones se administran a través de catéteres u otros dispositivos para permitir el acceso a un tejido a distancia de interés, tal

como un órgano interno. Las composiciones de la invención también se pueden administrar en dispositivos de tipo de liberación prolongada, bombas, implantes o formulaciones para permitir liberación lenta o sostenida de las composiciones. En realizaciones adicionales de la invención, las composiciones de la invención se administran "por vía locorregional", es decir, por vía intravesical, por vía intralesional y/o por vía tópica. En otras realizaciones de la invención, particularmente cuando se tratan tumores difusos (tales como leucemia) o enfermedad metastásica, las composiciones de la invención se pueden administrar por vía sistémica mediante vías de administración intravenosa o intraarterial.

Con el fin de demostrar el funcionamiento de la presente invención, los vectores recombinantes obtenidos a partir de adenovirus humano de tipo 5 se usaron para codificar especies de interferón. Dos vectores de adenovirus que contenían genes IFN α se evaluaron en estos estudios. Un vector contenía el gen de interferón humano $\alpha 2b$ (Ad-IFN $\alpha 2b$) y el otro contenía un gen de interferón "híbrido" humano quimérico que comprendía el extremo N $\alpha 2$ humano unido al extremo C $\alpha 1$ humano (Ad-IFN $\alpha 2\alpha 1$). Mientras que la actividad de IFN generalmente está limitada a especies, el interferón híbrido (también conocido como "universal" o IFN A/D) es activo en células obtenidas a partir de una diversidad de especies de mamífero incluyendo ratón y ser humano. Estos dos vectores de interferón permitieron la evaluación del efecto de vectores IFN α recombinantes sobre tumores humanos y de los efectos más amplios del interferón híbrido que pueden provocar respuestas tanto en células murinas como en células de xenoinjerto del tumor humano presente en el modelo de ratón.

Para evaluar la respuesta a terapia génica de IFN intravesical y de proteína, se usó un modelo de tumor de vejiga ortotópico en ratones desnudos. El modelo se describe por Watanabe y col., Cancer Gene Therapy, 7: 1575-1580 (2000) y Zhou y col., Cancer Gene Therapy, 9: 681-686 (2002). La cantidad de tumor encontrado en cortes histológicos de las vejigas tomadas 21 días después del tratamiento fue altamente correlativa con la carga tumoral calculada mediante formación de imágenes. Antes del tratamiento intravesical, la carga total de células KU7 dentro de la vejiga de cada ratón se sometió a formación de imágenes y se cuantificó dos semanas después de que las células cancerosas se instilaron en conformidad con las enseñanzas de Watanabe y col. Para instilación intravesical, los vectores se administraron junto con Syn3 (Ejemplo 1). Después los ratones recibieron diversos tratamientos intravesicales durante una hora o dos días consecutivos como se ha descrito en los Ejemplos en el presente documento. Tres semanas después las vejigas se sometieron a formación de imágenes nuevamente para determinar cambios en la carga tumoral. Como se muestra en la Figura 1 de los dibujos adjuntos, cuando se usó Ad-IFN $\alpha 2\alpha 1$ /Syn3 o Ad-IFN $\alpha 2b$ /Syn3, se observó una regresión tumoral marcada ($P < 0,0024$). Por el contrario, los tumores crecieron rápidamente a continuación del tratamiento con el control Ad- βgal /Syn3, Ad-IFN $\alpha 2\alpha 1$ o Syn3 en solitario. Estos resultados indican que Syn3 potenció de forma marcada la eficacia de vectores adenovirales que codifican IFN α .

Debido a que la proteína IFN α intravesical se usa en ensayos clínicos para cáncer de vejiga superficial en solitario o en combinación con BCG, se condujeron experimentos para delimitar aún más las diferencias en la actividad de Ad-IFN frente a la terapia de proteína de interferón. La eficacia de la proteína de interferón híbrida se comparó con Ad-IFN $\alpha 2a 1$ en el modelo de tumor ortotópico descrito anteriormente. Cuando se proporcionaron 200.000 unidades (2 MUI/ml) de proteína IFN $\alpha 2\alpha 1$ por vía intravesical durante 1 hora en 2 días consecutivos, no se observó regresión tumoral significativa. No se detectaron efectos antitumorales cuando se instiló proteína IFN $\beta 2\alpha 1$ los días 1, 7 y 14 y se evaluó la carga tumoral 21 días después del primer tratamiento. Estos resultados difieren del efecto observado a continuación de la terapia de Ad-IFN $\alpha 2\alpha 1$ /Syn3 como se ha demostrado en la Figura 1. El urotelio parecía similar en todos los grupos de tratamiento que incluyen un grado suave de hiperplasia que estaba relacionado con el tratamiento con tripsina inicial del urotelio necesario para promover la adhesión de células tumorales inicial.

Con el fin de evaluar el nivel y la duración de la expresión de interferón a continuación de Ad-IFN α /Syn3 intravesical, se condujeron una serie de experimentos usando ratones atímicos que no portaban tumor con las mismas concentraciones de Ad-IFN $\alpha 2b$ /Syn3 utilizadas para los estudios de eficacia anteriores y se comparó un tratamiento intravesical único con dos días consecutivos de exposición durante una hora. La proteína IFN en el tejido de vejiga se ensayó recogiendo las vejigas de ratón en diversos momentos después del tratamiento y ensayando para determinar la proteína IFN presente en homogenados de tejido usando un ensayo de ELISA. Un día después del tratamiento, las vejigas contenían aproximadamente 50.000 pg/mg de Intrón A, que disminuyó lentamente hasta 5.000-10.000 pg/mg para el día 7 como se muestra en la Figura 2, Panel A de los dibujos adjuntos. En ratones que recibían un segundo tratamiento de Ad-IFN $\alpha 2b$ /Syn3, las concentraciones en tejido alcanzaron 100.000 pg/mg y permanecieron más elevadas durante un periodo de 7 días en comparación con la exposición única. Por el contrario, cuando se instilaron 200.000 UI de proteína IFN, las concentraciones de IFN medidas en homogenados de tejido una hora después del tratamiento fueron < 1.000 pg/mg y no se detectó proteína IFN en momentos posteriores. Se observaron concentraciones elevadas de proteína IFN en la mayoría de células uroteliales mediante análisis inmunohistoquímico 2 días después de tratamiento con Ad-IFN $\alpha 2\alpha 1$ /Syn3 o Ad-IFN $\alpha 2b$ /Syn3 (Figura 2, Panel B). Se observó tinción similar en muchas de las células tumorales humanas adyacentes (Figura 2, Panel B). En ratones Balb/C exogámicos, también se pudo observar tinción de IFN marcada en muchas de las células uroteliales cinco días después de tratamiento en dos días consecutivos con Ad-IFN $\alpha 2\alpha 1$ /Syn3 o Ad-IFN $\alpha 2b$ /Syn3 (Figura 2, Panel C). Adicionalmente, la vejiga pareció mostrar poca evidencia de toxicidad local tras el examen histológico (Figura 2, Panel C). Esto es particularmente importante en los ratones tratados con Ad-IFN $\alpha 2\alpha 1$ /Syn3 ya que el IFN híbrido es

activo en células de ratón.

Con el fin de ilustrar más completamente el efecto de los vectores que codifican interferón en el tratamiento de tumores resistentes a interferón, se condujeron una serie de experimentos para evaluar los vectores que codifican interferón en líneas celulares de tumores resistentes a interferón. Algunas líneas de células de cáncer de vejiga humano son resistentes a muerte celular inducida por interferón incluso después de exposición a más de 100.000 UI/ml de IFN α o proteínas de IFN α *in vitro* de acuerdo con el ensayo MTT descrito en el presente documento. Determinadas líneas celulares tumorales resistentes a interferón incluyen las células KU7 (que se usaron en los estudios de eficacia anteriores) y células 253J B-V. Cuando se expusieron a vectores recombinantes que codifican interferón, estas líneas celulares tumorales resistentes a interferón demostraron sensibilidad a tratamiento con Ad-IFNq. Por ejemplo, la transducción de células KU7 o 253J-BV con una MOI 50 de Ad-IFN- α 2 α 1 o Ad-IFN- α 2b dio como resultado la expresión de IFN α elevada en aproximadamente el 50% de las células determinada mediante tinción inmunocitoquímica para proteína IFN. Con frecuencia se observó una tinción de IFN perinuclear marcada (Figura 3, Panel A) acompañada por cambios morfológicos tales como un aumento de tamaño y una reducción marcada en el número de mitosis. Esto dio como resultado la parada del ciclo celular significativa en G₂/M (Figura 3, Paneles B y C), fragmentación de ADN característica de apoptosis (Figura 3, Paneles B y C) y citostasis (Figura 3, Panel D).

Para esclarecer más completamente el mecanismo o mecanismos que subyacen a la inducción de muerte celular de estas líneas celulares tumorales resistentes a interferón a continuación de exposición a Ad-IFN, los efectos de Ad-IFN α sobre la activación de caspasa-3 como un marcador independiente de apoptosis. La transducción con Ad-IFN α estimuló la activación marcada de caspasa-3 en ambas líneas celulares (Figura 4, Paneles A y B). Se observó tinción de caspasa-3 en células que muestran un nivel elevado de expresión de IFN α así como en muchas células adyacentes que no mostraron evidencia de expresión de IFN α (Figura 4a). Además, cuando el porcentaje de células positivas a caspasa-3 se cuantificó en las líneas celulares tanto 253J-BV como KU7 72 h después del tratamiento con Ad-IFN a la misma MOI 50, más del 70% de estas células fueron positivas a caspasa-3 (Figura 4, Panel B). La exposición a Ad-IFN α dio como resultado citotoxicidad sustancial, ya que no volvió a crecer una población de las células cuando se cultivó a lo largo de periodos extendidos. Estos resultados fueron similares en líneas de células de cáncer de vejiga evaluadas, incluyendo todas las líneas celulares resistentes a la proteína IFN α . No se observaron cambios de este tipo en estas células a continuación de tratamiento con hasta 100.00 UI/ml de la proteína IFN α o Ad- β gal a una MOI similar. Debido a que no más del 50% de las células se transducen a esta MOI, esto también proporcionó evidencia adicional para apoyar un efecto colateral inducido por Ad-IFN marcado.

Para examinar la cantidad de proteína IFN preparada en cultivo mediante Ad-IFN a lo largo del tiempo las células tanto KU7 como 253J B-V se trataron con una MOI de 50 y 100 de Ad-IFN α 2b durante 2,5 h o con 100.000 UI/ml de Intrón A. Mientras la concentración de proteína IFN en el sobrenadante permaneció constante a aproximadamente 400.000 pg/ml a continuación de tratamiento con Intrón A (~4 pg/UI), las concentraciones alcanzaron casi 10.000.000 de pg/ml (~2.500.000 UI) seis días después de tratamiento con MOI 50 de Ad-IFN α 2b, y se registraron niveles similares dos días después de la exposición a MOI 100 de Ad-IFN α 2b (Figura 5, Panel A).

En base a estos resultados, los efectos después de la adición de 2.500.000 UI/ml de Intrón A se compararon con aquellos observados después del tratamiento con una MOI 50 de Ad-IFN α 2b a 48 y 72 h. Se observó un aumento en el número de células subdiploides en las células tratadas con Ad-IFN como se había observado previamente, especialmente 72 h después de la infección, mientras que no se observó aumento en las células después de la exposición a Intrón A a una concentración elevada (Figura 5, Panel B). De forma similar, no se observaron cambios morfológicos o de tinción de IFN en células 48 y 72 h después de la exposición a Intrón A en comparación con células de control, mientras que los cambios morfológicos típicos y tinción de IFN se observaron en las células tratadas con Ad-IFN (Figura 5, Panel C). Sin embargo, existió un aumento significativo en el porcentaje de células G₂/M a 48 y 72 h después de tratamiento con Intrón A y esto igualó los cambios observados a continuación de la exposición a Ad-IFN. Por ejemplo, en células KU7 la población de G₂/M a 48 h después del tratamiento para los grupos de control, Intrón A y Ad-IFN fue de 9,7, 23,4 y 33,4, respectivamente, así como 7,4, 21,3 y 19,5 a 72 h.

Los vectores que codifican los interferones tanto IFN α 2b como híbrido demuestran claramente que Ad-IFN α intravesical tiene actividad antitumoral potente. Cuando la carga tumoral se comparó antes y después del tratamiento, aquellos tumores que habían recibido Ad-IFN α 2 α 1 o Ad-IFN α 2b en una formulación de Syn3 presentaron una reducción marcada en el tamaño del tumor, mientras que los tumores de vejiga crecieron rápidamente en los ratones tratados con Ad- β -gal/Syn3 así como Ad-IFN α 2 α 1, Syn3 o proteína IFN α 2 α 1 en solitario. También se observó toxicidad local mínima con cualquier tratamiento.

Aunque diversas líneas de células de cáncer de vejiga, incluyendo las células KU7 usadas en los presentes experimentos *in vivo*, fueron resistentes a niveles elevados de la proteína IFN α misma en cultivo, las mismas se eliminaron uniformemente en cultivo celular por Ad-IFN α de una manera dependiente de caspasa a concentraciones de partícula que dieron como resultado la transducción de únicamente el 50% o menos de células. Estos resultados confirman que los vectores que codifican especies de interferón tales como Ad-IFN α poseen efectos colaterales marcados y la capacidad de superar la resistencia a la proteína IFN.

En resumen, los experimentos anteriores demuestran que los interferones administrados por vector recombinante poseen propiedades únicas diferentes de la proteína IFN recombinante disponible en el mercado y que los vectores que codifican IFN pueden superar la resistencia a la proteína IFN. Con respecto al cáncer de vejiga, los estudios ilustran claramente que la instilación intravesical de Ad-IFN- $\alpha 2\alpha 1$ /Syn3 o Ad-IFN- $\alpha 2b$ /Syn3 durante una hora en días consecutivos provocaba una regresión marcada en el crecimiento de tumores de vejiga superficiales humanos en ratones atímicos cuando la carga tumoral se determinó 3 semanas después de tratamiento. El tratamiento similar con 200.000 UI por día de la proteína IFN- $\alpha 2\alpha 1$ no dio como resultado niveles en tejido de IFN a largo plazo y no tuvo efecto en el crecimiento de los tumores. Debido a que Ad-IFN- $\alpha 2\alpha 1$ /Syn3 y Ad-IFN- $\alpha 2b$ /Syn3 fueron comparables en la producción de citotoxicidad *in vitro* y la regresión tumoral *in vivo*, el efecto directo de expresión sostenida de IFN fue un factor sustancial en la regresión tumoral en lugar de su efecto sobre el microentorno del tumor en este modelo debido a que IFN $\alpha 2b$ activa únicamente las rutas de señalización de interferón en células humanas, aunque el mismo se puede producir en células tanto de ratón como humanas. Los datos también demuestran que Ad-IFN α puede provocar citotoxicidad dependiente de caspasa en células de cáncer de vejiga resistentes a concentraciones elevadas de la proteína IFN. La apoptosis fue evidente no sólo en células de cáncer de vejiga que muestran niveles elevados intracelulares de IFN α mediante tinción inmunquímica sino también en células adyacentes que no demostraron expresión de IFN α . Estos resultados demuestran que el tratamiento con Ad-IFN α puede producir un efecto colateral marcado en células vecinas que se puede dirigir a células tumorales que escaparon a la infección por Ad-IFN α .

Una preocupación potencial para la aplicación clínica de cualquier agente son sus efectos secundarios tóxicos potenciales. Sin embargo, estos estudios demuestran claramente una carencia de toxicidad asociada con la administración de vectores recombinantes que codifican interferón, aunque existe un nivel de interferón elevado y persistente producido por los vectores. Los resultados a partir de los estudios anteriores demuestran que no hay cambios morfológicos significativos en el urotelio normal cuando los ratones atímicos se examinaron tres semanas después de tratamiento con Ad-IFN $\alpha 2\alpha 1$ /Syn3. Además, cuando los ratones exogámicos normales que no portaban tumor se trataron de forma similar con Ad-IFN $\alpha 2\alpha 1$ /Syn3 y se examinaron para determinar patología aguda en la vejiga hasta 21 días después de la exposición, no se identificaron cambios significativos tras el examen histológico de la vejiga. Adicionalmente, los experimentos piloto en ratas demostraron que aunque la expresión de transgén de interferón fue elevada en la orina de ratas, las concentraciones en suero fueron mínimas indicando exposición sistémica baja después de tratamiento con Ad-IFN intravesical. Estos resultados iniciales de eficacia y toxicidad sugieren que Ad-IFN $\alpha 2b$ /Syn3 se tolerará bien.

La presente invención proporciona además formulaciones farmacéuticas que comprenden los vectores de la presente invención. Las composiciones de la invención se formularán para administración mediante maneras conocidas en la técnica aceptables para administración a un sujeto mamífero, preferentemente un ser humano. En particular, los sistemas de administración se pueden formular para administración intramuscular, intravenosa, dispositivos de tipo de liberación prolongada inyectable o administración tópica.

En el caso en el que se emplea un sistema de administración génica no viral, el plásmido de expresión que contiene el gen de interferón se puede encapsular en liposomas. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones de fosfolípido, capas lamelares y similares. La administración de secuencias de ADN a células diana usando vehículos de liposoma se conoce bien en la técnica. Una diversidad de procedimientos está disponible para la preparación de liposomas, como describe, por ejemplo, Szoka y col., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9: 467 (1980), Szoka, y col., Patente de los Estados Unidos Nº 4.394.448, expedida el 19 de julio de 1983, así como las Patentes de los Estados Unidos Nº 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369. Los liposomas en la práctica de la presente invención se pueden formar a partir de uno o más lípidos formadores de vesícula convencionales, que generalmente incluyen fosfolípidos neutros y cargados negativamente y un esterol, tal como colesterol. Los ejemplos de tales lípidos de formación de vesícula incluyen DC-chol, DOGS, DOTMA, DOPE, DOSPA, DMRIE, DOPC, DOTAP, DORIE, DMRIE-HP, carbamato de n-espermidina colesterol y otros lípidos catiónicos como se describe en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.650.096. La selección de lípidos generalmente se guía por la consideración de, por ejemplo, el tamaño del liposoma, labilidad ácida y estabilidad de los liposomas en el torrente sanguíneo. Se pueden añadir componentes adicionales a la formulación de liposoma para aumentar la semivida en suero tal como revestimiento de polietilenglicol (denominado "PEG-ilación") como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Nº 5.013.556, expedida el 7 de mayo de 1991 y 5.213.804, expedida el 25 de mayo de 1993.

Las composiciones de la invención se formularán para administración mediante maneras conocidas en la técnica aceptables para administración a un sujeto mamífero, preferentemente un ser humano. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente a un tejido mediante inyección o en un vaso sanguíneo que irriga el tejido de interés. En realizaciones adicionales de la invención las composiciones de la invención se administran por vía "locorregional", es decir, por vía intravesical, por vía intralesional y/o por vía tópica. En otras realizaciones de la invención, las composiciones de la invención se administran por vía sistémica mediante inyección, inhalación, supositorio, administración transdérmica, etc. En realizaciones adicionales de la invención, las composiciones se administran a través de catéteres u otros dispositivos para permitir el acceso a un tejido distante de interés, tal como un órgano interno.

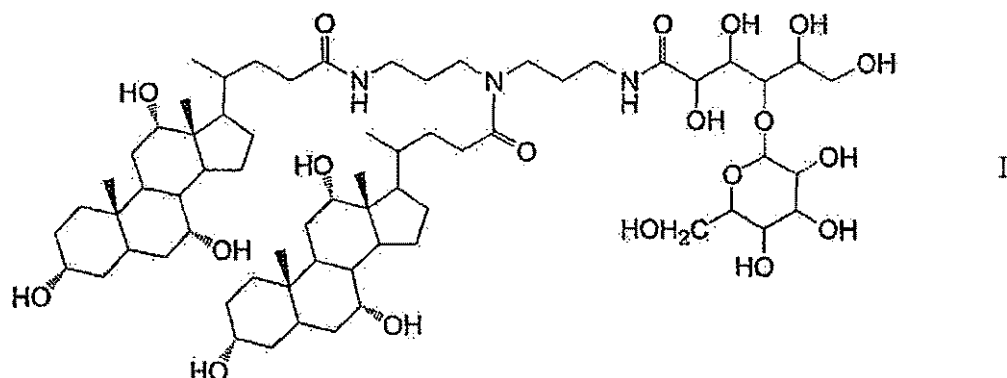
Las composiciones de la invención también se pueden administrar en formulaciones tópicas o matrices poliméricas, matrices de hidrogel, implantes poliméricos o formulaciones encapsuladas para permitir la liberación lenta o sostenida de las composiciones. Cuando el sistema de administración se formula como una solución o suspensión, el sistema de administración está en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso. Se puede usar una

diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,8%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas o se pueden esterilizar por filtración. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para su uso tal cual o liofilizar, combinando la preparación liofilizada con una solución estéril antes de la administración.

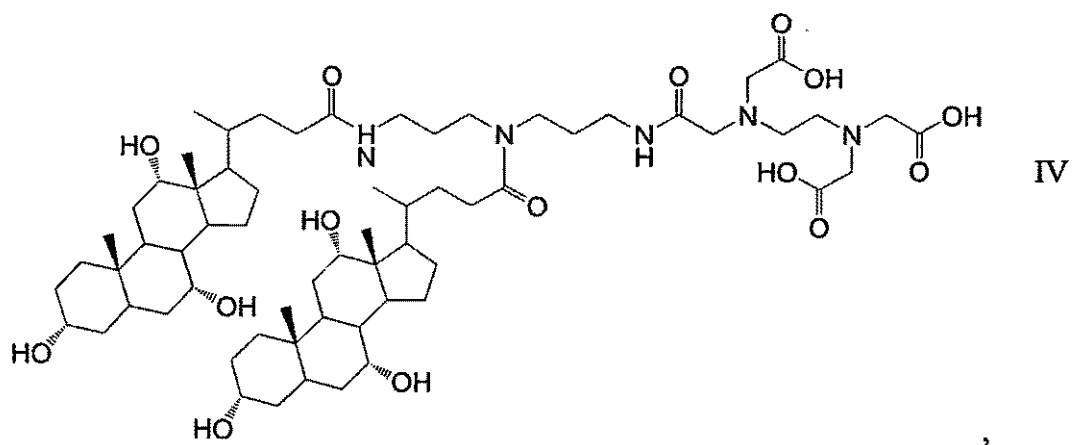
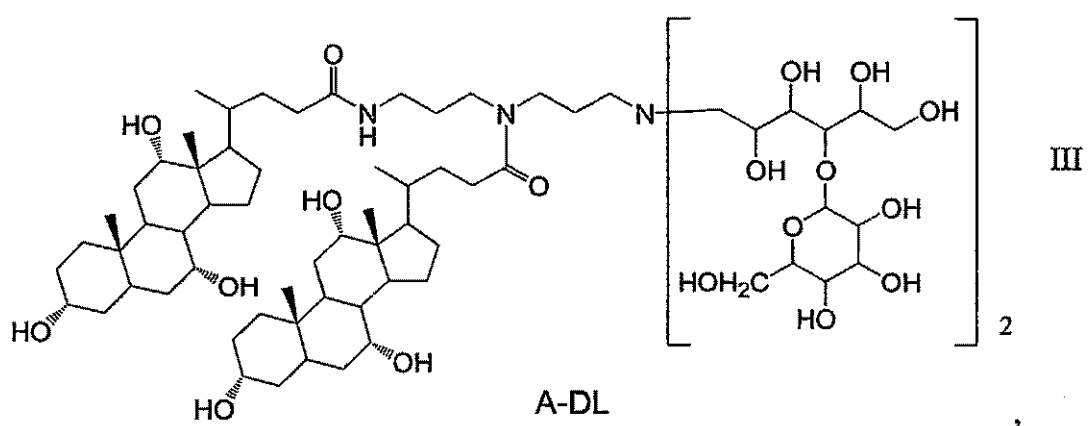
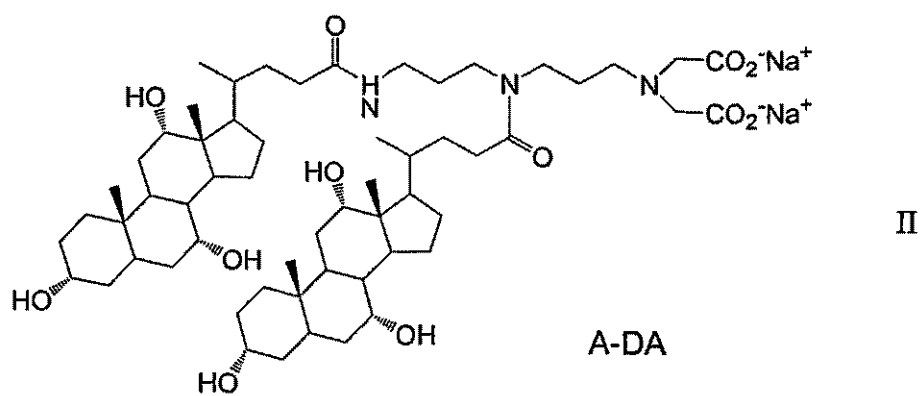
Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para asemejarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y tampón, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitan, oleato de trietanolamina, etc.

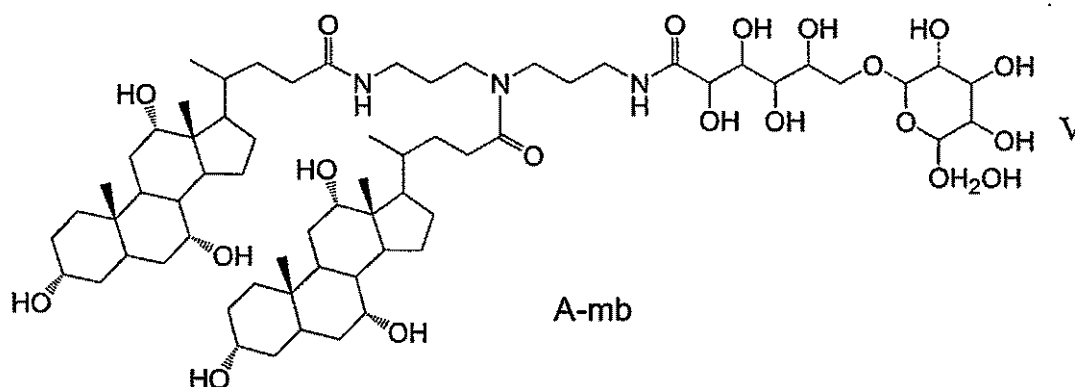
La concentración de las composiciones de la invención en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente el 0,1%, habitualmente a o al menos aproximadamente el 2% hasta tanto como el 20% al 50% o más en peso, y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc, de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado.

En algunas aplicaciones, es deseable administrar el vector recombinante junto con agentes potenciadores que faciliten la transferencia del ácido nucleico que codifica interferón a la célula diana. Los ejemplos de tales agentes potenciadores incluyen detergentes, alcoholes, glicoles, tensioactivos, sales biliares, antagonistas de heparina, inhibidores de ciclooxigenasa, soluciones de sal hipertónicas y acetatos. Los alcoholes incluyen por ejemplo los alcoholes alifáticos tales como etanol, N-propanol, isopropanol, alcohol butílico, alcohol acetílico. Los glicoles incluyen glicerina, propilenglicol, polietilenglicol y otros glicoles de peso molecular bajo tales como glicerol y tioglicerol. Los acetatos tales como ácido acético, ácido glucónico y acetato de sodio son ejemplos adicionales de agentes potenciadores de administración. Las soluciones de sal hipertónicas como NaCl 1 M también son ejemplos de agentes potenciadores de administración. Las sales biliares tales como taurocolato, tauro-desoxicolato de sodio, desoxicolato, quenodesoxicolato, ácido glicocólico, ácido glicoquenodesoxicólico y otros astringentes tales como nitrato de plata se pueden usar. Los antagonistas de heparina tales como aminas cuaternarias tales como sulfato de protamina también se pueden usar. También se pueden emplear detergentes aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos para potenciar la transferencia génica. Los detergentes ilustrativos incluyen pero sin limitación taurocolato, desoxicolato, taurodesoxicolato, cetilpiridio, cloruro de benzalconio; detergente Zwittergent 3-14, CHAPS (3-[(3-Colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato hidrato), Big CHAP, Desoxi Big CHAP, detergente Triton-X-100, C12E8, Octil-B-D-Glucopiranosido, detergente PLURONIC-F68, detergente Tween 20 y detergente TWEEN 80 (CalBiochem Biochemicals). Agentes potenciadores y procedimientos particularmente preferidos se describen por Engler y col., Patente de los Estados Unidos N° 6.312.681, expedida el 6 de noviembre de 2001, Engler y col., Patente de los Estados Unidos N° 6.165.779, expedida el 26 de diciembre de 2000 y Engler y col., Patente de los Estados Unidos N° 6.392.069, expedida el 21 de mayo de 2002, cuyos contenidos completos se incorporan por referencia en el presente documento. Un agente potenciador particularmente preferido útil en la práctica de la presente invención es un compuesto denominado Syn3 de la Fórmula I:



Agentes potenciadores adicionales útiles en la práctica de la presente descripción incluyen, pero sin limitación, los compuestos de las Fórmulas II, III, IV y V y sus sales farmacéuticamente aceptables:





Los esfuerzos iniciales para transducir el urotelio usando vectores de adenovirus tuvieron éxito limitado, debido en parte a la presencia de una barrea antiadherencia que protege frente a infecciones. Pagliaro y col., J. Clin. Oncol., 15: 2247-2253 (2003). Se ha identificado un excipiente, Syn3, que potencia espectacularmente la transducción de adenovirus del urotelio. Connor y col., Gene Ther., 8: 41-8 (2001); Yamashita y col., Cancer Gene Therapy, 9: 687-691 (2002). En modelos animales, la administración intravesical de vectores de adenovirus en una formulación de Syn3 aumentó marcadamente la expresión génica tanto en urotelio normal como en tumores de vejiga superficiales. Los efectos potenciadores de Syn3 se mantienen a lo largo de una ventana de tiempo de aproximadamente 1 hora. Por consiguiente, los vectores recombinantes de la presente invención cuando se usan junto con Syn3 se administran preferentemente simultáneamente y generalmente dentro de un periodo de aproximadamente 1 hora a continuación de la exposición de la vejiga a Syn3.

La presente invención proporciona además un procedimiento para tratar un organismo mamífero que contiene un tumor administrando al organismo mamífero una formulación farmacéutica que comprende un vector recombinante que codifica un interferón. La expresión: "organismo mamífero" incluye, aunque sin limitación, seres humanos, cerdos, caballos, vacas, perros y gatos. Cuando el vector es un vector adenoviral recombinante, preferentemente se emplea un vector adenoviral endógeno al tipo de mamífero que se está tratando. Aunque generalmente se prefiere emplear un virus de la especie que se tiene que tratar, en algunos casos, puede ser provechoso usar vectores obtenidos a partir de especies diferentes que poseen características patogénicas favorables. Por ejemplo, se indica (Publicación Internacional PCT N° WO 97/06826, publicada el 10 de abril de 1997) que se pueden usar vectores adenovirales bovinos en terapia génica humana para minimizar la respuesta inmune característica de vectores adenovirales humanos. Al minimizar la respuesta inmune inicial, se evita una eliminación sistémica rápida del vector dando como resultado una duración mayor de acción del vector. Una respuesta inmunológica preexistente o inducida a la administración *in vivo* repetida de vectores virales ha sido asociada con un efecto terapéutico disminuido de vectores virales administrados por vía sistémica a través de múltiples ciclos de administración. Aunque esto se puede superar mediante ajustes a la dosis, también se pueden administrar los vectores de la presente invención en combinación con agentes inmunosupresores. Los ejemplos de agentes inmunosupresores incluyen, pero sin limitación, ciclosporina, azatioprina, metotrexato, ciclofosfamida, inmunoglobulina de linfocito, anticuerpos frente al complejo CD3, adrenocorticosteroides, sulfasalzaina, FK-506, metoxsalen y talidomida. Como alternativa, la eliminación transitoria de anticuerpos antivirales se puede conseguir de acuerdo con los contenidos de La Face y col., Patente de los Estados Unidos N° 6.464.976, expedida el 15 de octubre de 2002.

La determinación del régimen de dosificación óptimo para el tratamiento de la enfermedad se basará en una diversidad de factores que están dentro del criterio del médico a cargo del caso, tales como la progresión de la enfermedad en el momento de tratamiento, edad, peso, sexo, el tipo de vector que se esté empleando, si se está formulando con un agente potenciador de la administración, la frecuencia de administración, etc. Sin embargo, se ha demostrado que los vectores adenovirales recombinantes son seguros y eficaces en seres humanos en el intervalo de dosis entre 1×10^5 y 1×10^{12} partículas virales por dosis en un régimen de dosificación múltiple a lo largo de un periodo de varias semanas. Por consiguiente, la administración de vectores adenovirales recombinantes que codifican interferón se puede usar en tales intervalos de dosificación.

En la práctica preferida de la presente invención para el tratamiento de cáncer de vejiga superficial en seres humanos, se instila un ciclo de tratamiento que una dosis de desde 1×10^{10} /ml hasta 1×10^{12} /ml (más preferentemente aproximadamente 1×10^{11} /ml) partículas adenovirales recombinantes que codifican interferón $\alpha 2b$ en un volumen de aproximadamente 100 ml por vía intravesical durante un periodo de aproximadamente una hora. Un ciclo de tratamiento alternativo que comprende una dosis de desde 1×10^{10} /ml hasta 1×10^{12} /ml (más preferentemente aproximadamente 1×10^{11} /ml) partículas adenovirales recombinantes que codifican interferón $\alpha 2b$ en un volumen de aproximadamente 100 ml se instila por vía intravesical durante un periodo de aproximadamente una hora seguido por una segunda dosis sustancialmente equivalente dentro de 7 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o en días consecutivos a continuación de la primera dosis. Cada ciclo de tratamiento es repetible, dependiendo del transcurso de la progresión de la enfermedad. En el caso de vectores recombinantes administrados por vía intravesical para el

tratamiento de cáncer de vejiga, la expresión génica de interferón óptima se observa generalmente cuando los ciclos de tratamiento están distanciados por al menos 14 días, más preferentemente aproximadamente 30 días y más preferentemente aproximadamente 90 días.

En la práctica preferida de la invención para el tratamiento de carcinoma hepatocelular en un ser humano, un régimen de dosificación que comprende aproximadamente 1×10^{10} - 1×10^{12} partículas de un vector adenoviral recombinante sin capacidad de replicación que expresa una especie de interferón intracelular se administra por vía intratumoral o a través de la arteria hepática durante un periodo de cinco a siete días consecutivos. Este régimen de dosificación se puede repetir a lo largo de un ciclo de terapia de aproximadamente tres a seis semanas. Un régimen de dosificación particularmente preferido para el tratamiento de carcinoma hepatocelular en un sujeto humano que sufre del mismo sería proporcionar administración arterial intrahepática de desde aproximadamente 1×10^{10} - 1×10^{12} partículas de un vector adenoviral recombinante sin capacidad de replicación que expresa interferón $\alpha 2b$ bajo el control del promotor de AFP durante aproximadamente cinco días consecutivos. Más preferentemente, este régimen de dosificación se lleva a cabo paralelamente con otros regímenes quimioterapéuticos.

En la situación en la que el vector es un vector con capacidad de replicación, el régimen de dosificación se puede reducir. Por ejemplo, se puede construir un vector adenoviral con capacidad de replicación en el que la replicación esté limitada sustancialmente a células de carcinoma hepatocelular usando el promotor de AFP (por ejemplo) para activar la expresión de proteínas E1 en lugar del promotor E1 nativo. Tal vector preferencialmente se replicaría en y expresaría interferón en células tumorales y posee la capacidad deseable de propagarse a células circundantes expandiendo el efecto terapéutico y permitiendo una dosis reducida o una duración más corta de tratamiento.

Las composiciones y procedimientos de la presente invención se pueden practicar solas o en combinación con agentes quimioterapéuticos o regímenes de tratamiento convencionales. Los ejemplos de tales agentes quimioterapéuticos incluyen inhibidores de síntesis de purina (por ejemplo, pentostatina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, metotrexato) o de síntesis de pirimidinas (por ejemplo, Pala, azarbina), la conversión de ribonucleótidos a desoxiribonucleótidos (por ejemplo, hidroxíúrea), inhibidores de síntesis de dTMP (5-fluorouracilo), agentes que dañan el ADN (por ejemplo, radiación, bleomicinas, etopósido, tenipósido, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, mitoxantrona, agentes alquilantes, mitomicina, cisplatino, procarbazona) así como inhibidores de la función de microtúbulos (por ejemplo, alcaloides de vinca y colchicina). Los regímenes de tratamiento quimioterapéutico se refieren principalmente a procedimientos no químicos diseñados para eliminar células neoplásicas tales como terapia de radiación. Estos agentes quimioterapéuticos se pueden administrar por separado o se pueden incluir con las formulaciones de la presente invención para administración conjunta. La presente invención también se puede practicar en combinación con regímenes de tratamiento inmunoterapéuticos convencionales tales como BCG en el caso de cáncer de vejiga superficial.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se consideran ilustrativos de la práctica de la presente invención y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la misma.

Ejemplo 1. Líneas celulares, Vectores y Reactivos:

Las líneas de células de cáncer de vejiga, KU7/GFP clon 6 y 253J-B-V, se usaron para estos estudios. El clon 6 de KU7/GFP se transfecta de forma estable con la proteína fluorescente verde y se usó para todos los estudios *in vivo*. Estas líneas celulares se describen por Watanabe y col., Cancer Gene Therapy, 7: 1575-1580 (2000). Las células se cultivaron en medio esencial mínimo modificado complementado con FCS al 10% y se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5% y aire al 95%.

Los vectores adenovirales recombinantes que codifican interferón $\alpha 2\alpha 1$ se prepararon de acuerdo sustancial con las enseñanzas de Ahmed y col., Interferon Cytokine Res., 21(6): 399-408 (2001). Los vectores adenovirales recombinantes que codifican IFN- $\alpha 2b$ y β -galactosidasa (β -gal) se prepararon de acuerdo sustancial con las enseñanzas de Ahmed y col., Hum. Gene Ther., 10(1): 77-8 (1999) y también se describen por Gregory y col., Patente de los Estados Unidos N° 6.210.939, expedida el 3 de abril de 2001.

La proteína Intrón A (interferón α -2b recombinante) está disponible en el mercado en Schering Corporation.

Syn3 se preparó de acuerdo con las enseñanzas de Engler y col., Patente de los Estados Unidos N° 6.392.069.

Ejemplo 2. Formación de tumor superficial, tratamiento y formación de imágenes:

Los procedimientos para el crecimiento de tumores superficiales de vejiga humanos KU7-GFP en ratones atímicos y su formación de imágenes se condujeron como se ha descrito previamente por Izawa y col., Clin. Cancer Res, 8: 1258-1270 (2002) y Zhou y col., Cancer Gene Therapy, 9: 681-686 (2002). En resumen, dos semanas después de que las células tumorales se instilaron, las vejigas se sometieron a formación de imágenes para determinar la presencia de tumor que contenía GFP. Después los ratones recibieron una instilación intravesical de 100 μ l de Ad-IFN- $\alpha 2\alpha 1$ /Syn3, Ad-IFN- $\alpha 2b$ /Syn3, Ad-IFN- $\alpha 2\alpha 1$, Ad- β -gal/Syn3, Syn3 o la proteína IFN- $\alpha 2\alpha 1$ durante 1 hora. Una sutura en bolsa de tabaco se ató alrededor de la uretra para asegurar la retención durante el procedimiento. Las

concentraciones de virus, Syn3 y proteína de interferón fueron 1×10^{11} P/ml y 1 mg/ml y 2×10^5 UI/100 μ l, respectivamente. Entre 6 a 8 ratones se trataron por grupo excepto para los grupos de Ad-IFN- $\alpha 2\alpha 1$ /Syn3 y Ad-IFN- $\alpha 2\alpha 1$ en los que se trataron 14 y 16 ratones, respectivamente.

Tres semanas después del primer tratamiento la vejiga se volvió a exponer y se formaron imágenes. A continuación de la eutanasia cada vejiga se instiló intravesicalmente posteriormente con 100 μ l de formalina al 10% y la uretra se suturó. Las vejigas después se retiraron, se fijaron en formalina al 10% y se impregnaron en bloques de parafina. Después se tomaron cortes a través de la vejiga para tinción con H & E para documentar la presencia o ausencia de tumor, así como para establecer la correlación de la formación de imágenes del tumor con la evidencia histológica del tumor.

Ejemplo 3. Estudios de expresión génica de homogenado:

Ratones atímicos hembra se anestesiaron, cateterizaron y recibieron una administración intravesical única de 100 μ l de Intrón A (2×10^6 UI/ml) o 1-2 tratamientos diarios con Ad-IFN/Syn3 (1×10^{11} P/ml: 1 mg/ml) durante 1 hora como se ha descrito anteriormente. A diversos intervalos las vejigas se recogieron y congelaron. Posteriormente las vejigas se descongelaron y transfirieron a tampón de lisis (Promega). Las muestras se homogeneizaron durante 20 s (Fast Prep, Q-BIOgene). Los homogenados después se ensayaron para determinar la concentración de proteína de interferón α humano usando un ELISA (Endogen). La concentración de proteína de interferón se expresó como pg de IFN/mg de tejido de vejiga.

Ejemplo 4. Análisis inmunoquímico

Para los estudios *in vivo* se realizó inmunohistoquímica de interferón de acuerdo sustancial con las enseñanzas de Izawa y col. anteriormente. Una reacción positiva se indicó mediante una tinción marrón. De forma similar, se realizó tinción de interferón para células en cultivo de acuerdo sustancial con las enseñanzas de Xu y col., Oncogene, 4: 807-812 (1989), con la excepción de que el anticuerpo primario usado fue una dilución 1:500 de anticuerpo policlonal de conejo frente a interferón α humano (Hu-IFN- α , PBL).

Ejemplo 5. Análisis estadístico:

Se realizó análisis estadístico con software Image-Pro[®] Plus versión 4.0 para Windows (disponible en el mercado en Media Cybernetics, Inc., 8484 Georgia Avenue, Suite 200, Silver Spring, MD 20910-5611 EE.UU.) para calcular el píxel de área de vejiga antes del tratamiento, de área GFP antes del tratamiento, de área de vejiga después del tratamiento y de área GFP después del tratamiento. Posteriormente, se calcularon los porcentajes de área GFP antes del tratamiento sobre área de vejiga antes del tratamiento y área GFP después del tratamiento sobre área de vejiga después del tratamiento. Se realizó un ensayo no paramétrico (ensayo de Kruskal-Wallis) para evaluar las diferencias en el cambio porcentual en el tamaño de tumor entre los 7 tratamientos como se ha descrito en Kruskal y Wallis, Journal of the American Statistical Association, 47: 583-621, Conover WJ, Practical Nonparametric Statistics. 3^a ed., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1952). Se usó estimulación de Monte-Carlo para determinar los valores p para el ensayo. Para ajustarse al hecho de que se estaban realizando muchos ensayos para comparar cada tratamiento con los otros, se usó una corrección de Bonferroni para examinar el nivel de significancia de cada uno de estos ensayos ($0,05/21 = 0,0024$). Para los resultados de MTT, el análisis se realizó usando el software General Lineal Models of the Statistica (disponible en el mercado en StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104).

Ejemplo 6. MTT, citometría de flujo, actividad de caspasa y medición de IFN en sobrenadantes:

Se realizaron ensayos MTT de acuerdo sustancial con las enseñanzas de Zhang y col., Cancer Res., 63: 760-765 (2003). En resumen, las células de tumor de vejiga se infectaron con un adenovirus determinado a una MOI de 50 y 100 durante 2,5 h. En diferentes puntos de tiempo se retiró el medio y se añadieron 200 μ l de medio que contenía 1 mg/ml de MTT. Después de 3 horas, la reacción se detuvo con 200 μ l de tampón de lisis de N,N-dimetilformamida y la solución resultante se leyó a A^{595} con un lector de microplacas. Placas de 60 mm adicionales se trataron de forma similar o con Intrón A y se recogieron para citometría de flujo y actividad de caspasa. Los sobrenadantes a partir de unas placas duplicadas se obtuvieron diariamente para medir la concentración de IFN para células expuestas a Ad-IFN- $\alpha 2b$ o Intrón A. El análisis del ciclo celular, el porcentaje de células subdiploides y la actividad de caspasa se determinaron de acuerdo sustancial con las enseñanzas de Williams y col., Mol. Cancer Ther., 2: 835-843 (2003). La concentración de Intrón A se midió usando un ELISA de acuerdo con las enseñanzas de Fujisawa y col., J. Interferon Cytokine Research, 16: 555-559 (1996) usando un kit de ELISA Endogen Brand Human IFN α disponible en el mercado con el N° de Catálogo EHIFNA de Pierce Biotechnology, Inc., P.O. Box 117, 3747 N. Meridian Road, Rockford, IL 61105 de acuerdo sustancial con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 7. Análisis de microscopía confocal para caspasa activa y localización de IFN α y su correlación con cambios morfológicos nucleares.

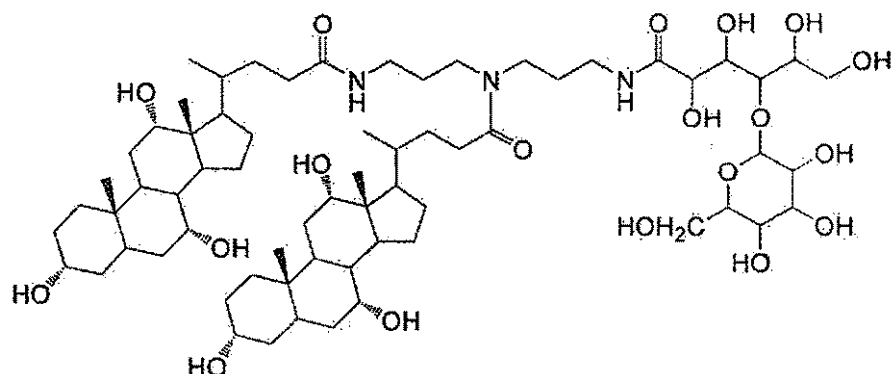
Líneas de células de vejiga humana se cultivaron en cubreobjetos en DMEM complementado con suero fetal bovino al 10% y después se infectaron con Ad- α -gal, IFN- $\alpha 2\alpha 1$ o Ad-IFN- $\alpha 2b$ a una MOI de 50 y 100. Treinta y seis horas después de la infección, las células se fijaron en metanol enfriado con hielo y después se bloquearon en suero de

5 cabra al 10% en PBS y se incubaron durante una noche con anticuerpos de conejo monoclonal anti-caspasa 3 activa (disponible en el mercado como N° de Catálogo RDI-CASP3ACTabRm en Research Diagnostics Inc., Pleasant Hill Road, Flanders NJ 07836) y de ratón monoclonal anti-IFN- α (disponible en el mercado como N° de Catálogo 31101-1 en PBL Biomedical Laboratories, 131 Ethel Road West, Suite 6, Piscataway, NJ 08854) a diluciones de 1:1.000 y 1:500, respectivamente. Después se añadieron anticuerpos anti conejo de cabra marcado con Alexa-488 y anti-ratón de cabra marcado con Alexa-546 (disponibles en el mercado como N° de Catálogo 11101 y 11010, respectivamente, en Molecular Probes, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402) junto con el colorante de ADN, 633-Topro-3 (disponible en el mercado en Molecular Probes) durante una hora adicional. Los portaobjetos montados se sometieron a formación de imágenes usando un microscopio confocal (Zeiss modelo LSM-510) y los píxeles se analizaron en cada canal usando láseres de Argón y He/Ne provistos de filtros ópticos apropiados. Las imágenes son representativas para al menos diez campos microscópicos analizados para cada condición. Cada experimento se realizó por duplicado y se repitió al menos tres veces.

10

REIVINDICACIONES

1. Un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación que codifica un interferón $\alpha 2b$ para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga, en el que el adenovirus se tiene que usar junto con un agente potenciador que tiene la fórmula:



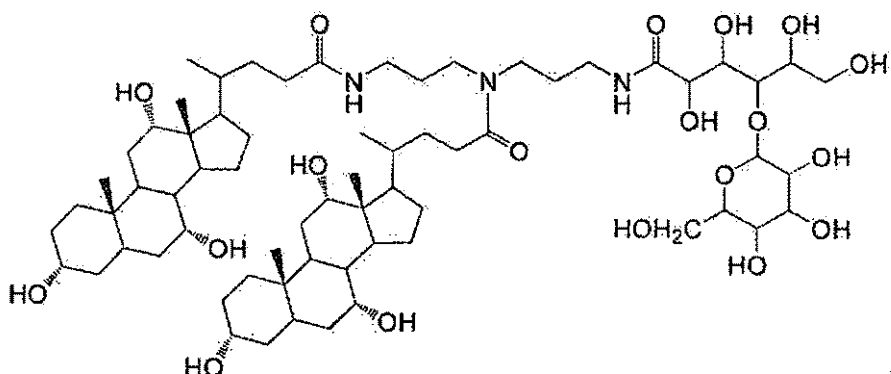
5

2. El adenovirus de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga, en el que el adenovirus se usa simultáneamente a la exposición de la vejiga al agente potenciador, preferentemente dentro de una hora de la exposición de la vejiga al agente potenciador.

3. El adenovirus de la reivindicación 1 ó 2 para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga, en el que el adenovirus y el agente potenciador son para ser administrados.

10

4. Un agente potenciador que tiene la fórmula:



para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga, en el que el agente potenciador son para ser administrados junto con un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación que codifica interferón $\alpha 2b$.

15

5. El agente potenciador de la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga, en el que el adenovirus se usa simultáneamente a la exposición de la vejiga al agente potenciador, preferentemente dentro de una hora de la exposición de la vejiga al agente potenciador.

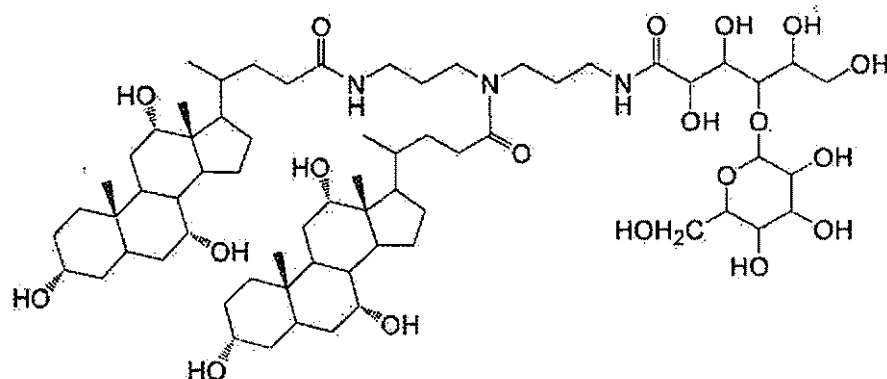
6. El agente potenciador de la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga, en el que el adenovirus y el agente potenciador son para ser administrados simultáneamente.

20

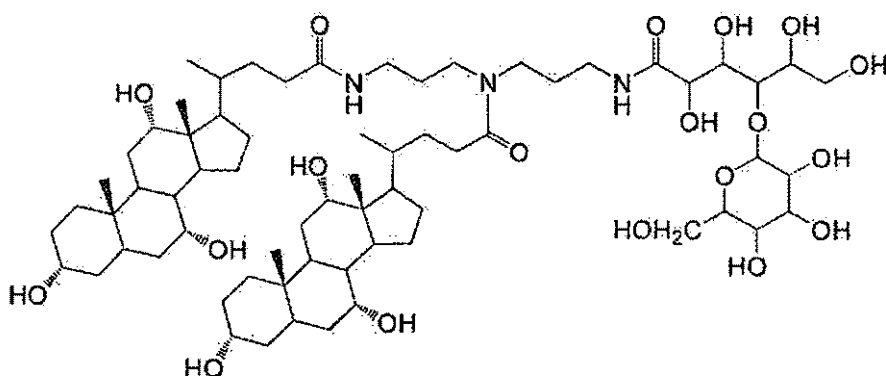
7. El agente potenciador de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga, en el que el tumor es un tumor superficial.

8. El uso de un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación que codifica un interferón $\alpha 2b$ para la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga, en el que el medicamento son para ser administrados junto con un agente potenciador de la técnica que tiene la fórmula:

25



9. El uso de un agente potenciador que tiene la fórmula:



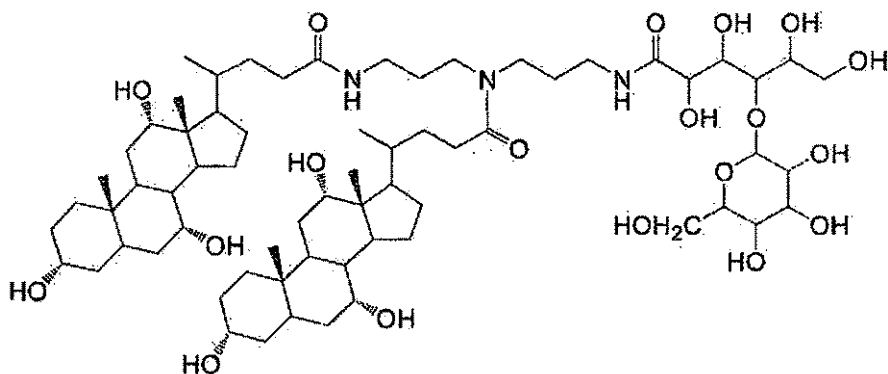
5 para la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga, en el que el medicamento son para ser administrados junto con un adenovirus recombinante sin capacidad de replicación que codifica un interferón $\alpha 2b$.

10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, en el que el adenovirus se usa simultáneamente a la exposición de la vejiga al agente potenciador, preferentemente dentro de una hora de la exposición de la vejiga al agente potenciador.

10 11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, en el que el adenovirus y el agente potenciador son para ser administrados simultáneamente.

12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el tumor es un tumor superficial.

13. Una formulación para instilación intravesical a la vejiga que comprende un agente potenciador o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que tiene la fórmula:



15

y un vector adenoviral recombinante sin capacidad de replicación que codifica interferón $\alpha 2b$ para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga.

14. El adenovirus de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga o la formulación de la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga, en el que el tumor es un tumor superficial.
- 5 15. El adenovirus o agente potenciador de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en el tratamiento de un tumor resistente a interferón de la vejiga, son para ser administrados por vía intravesical.
16. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento son para ser administrados por vía intravesical.

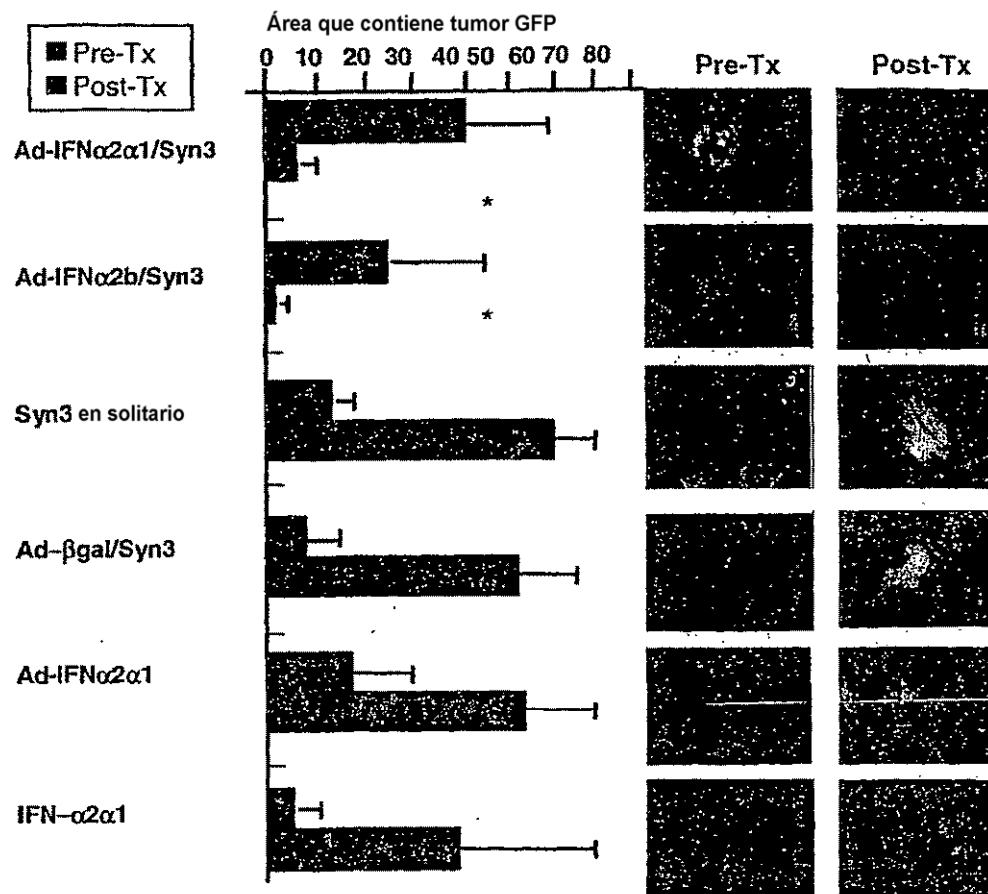
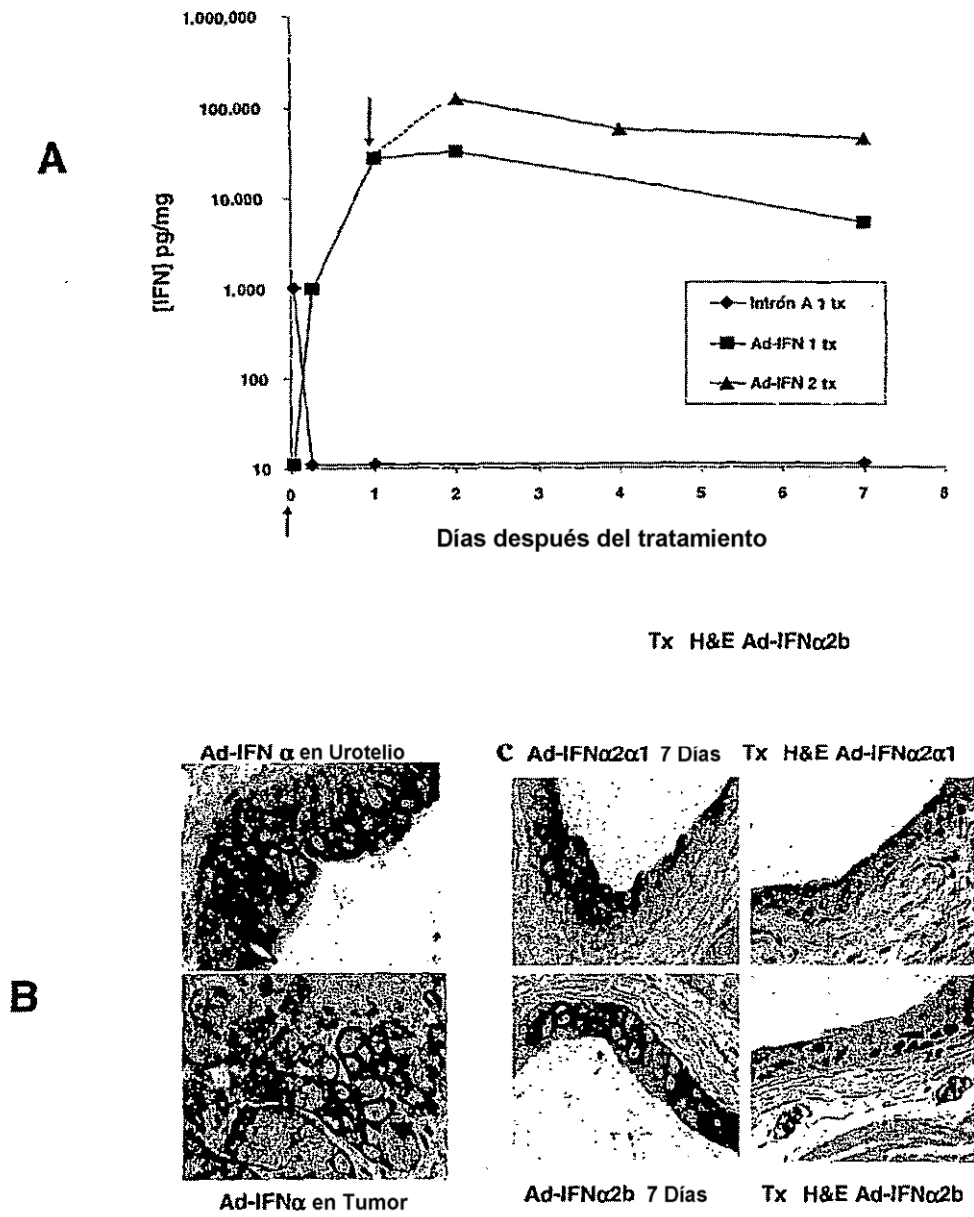


Figura 1



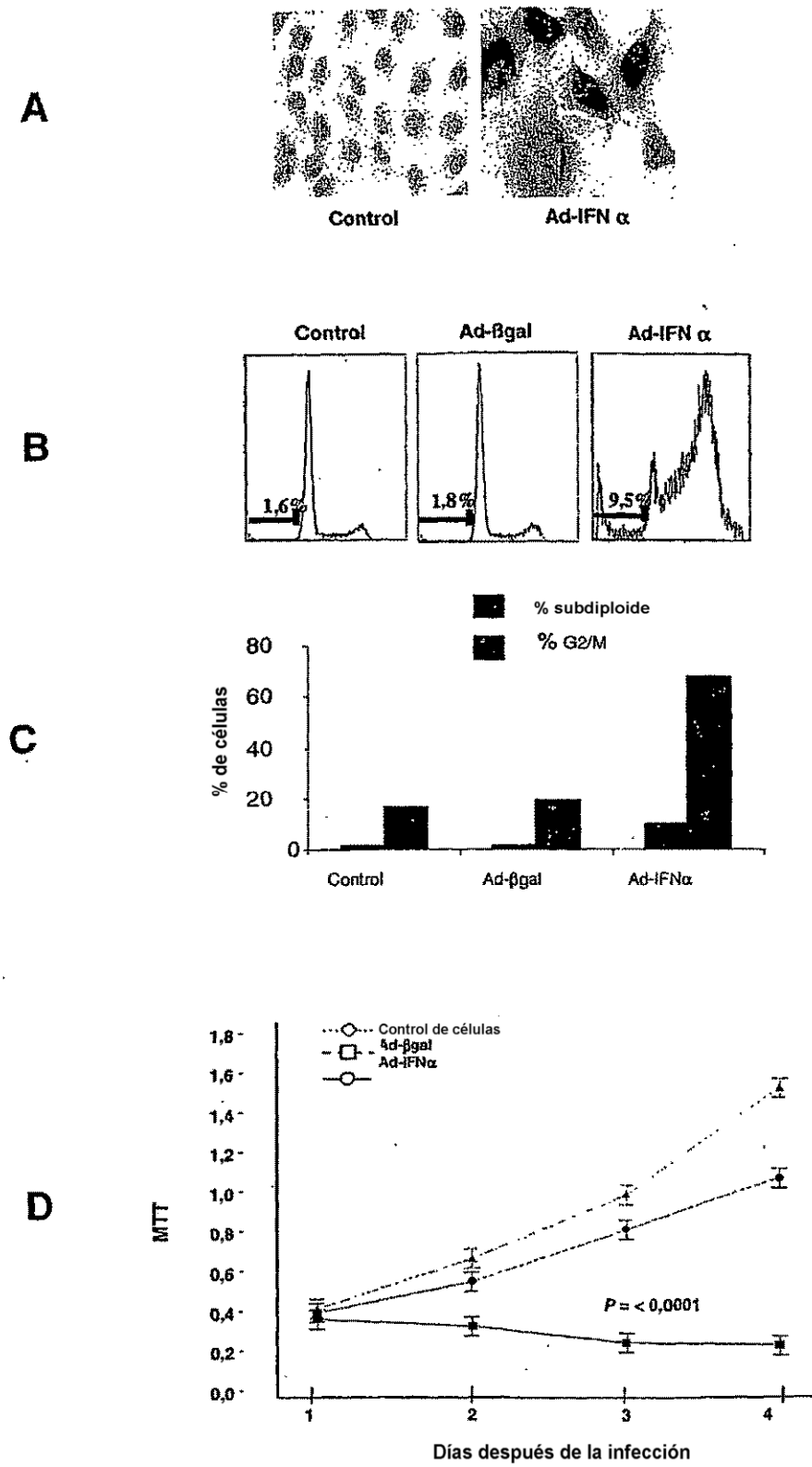


Figura 3

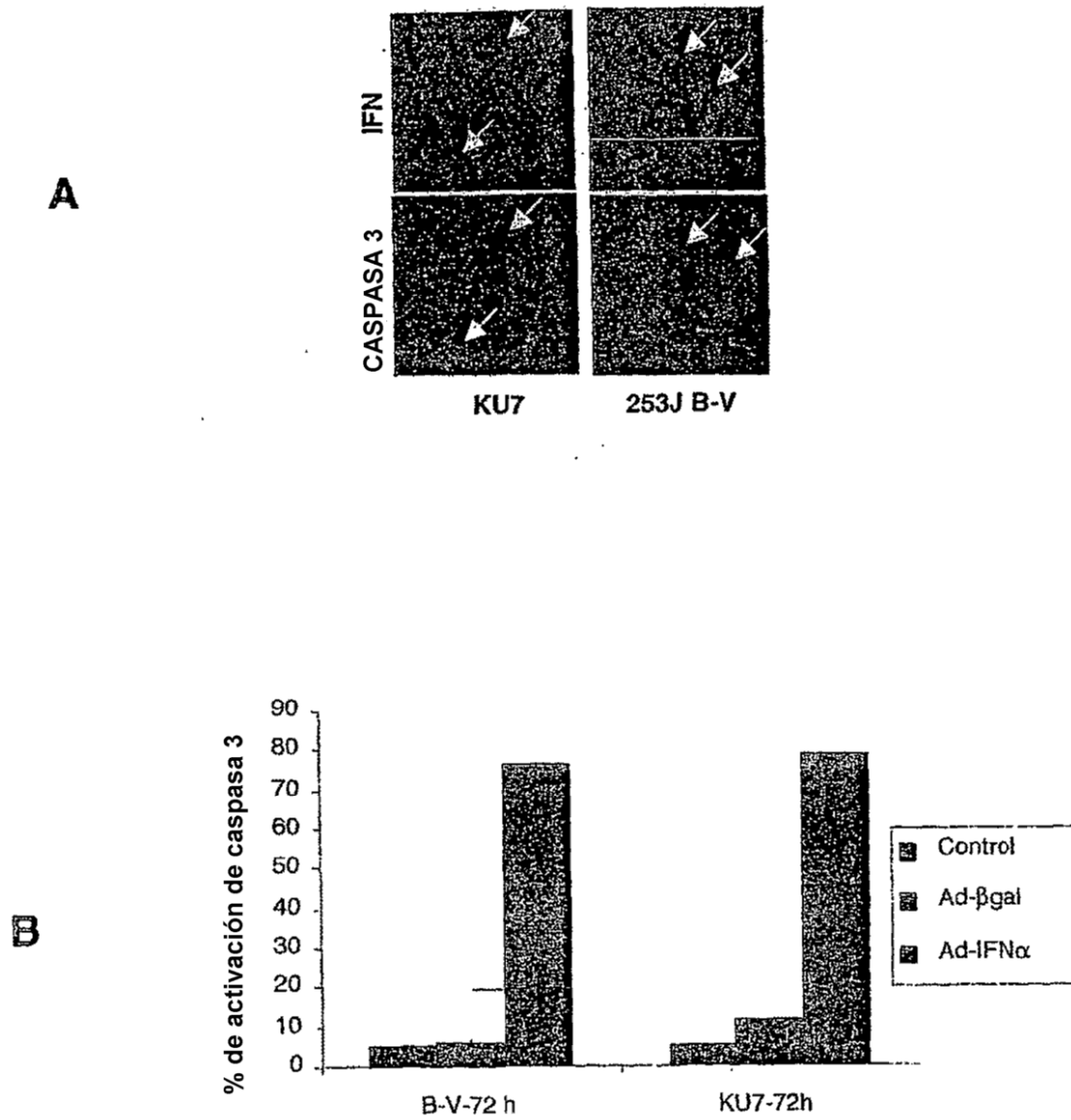
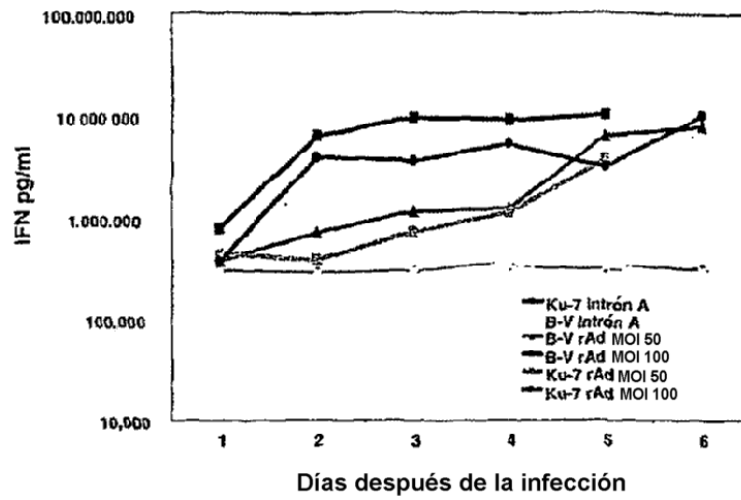
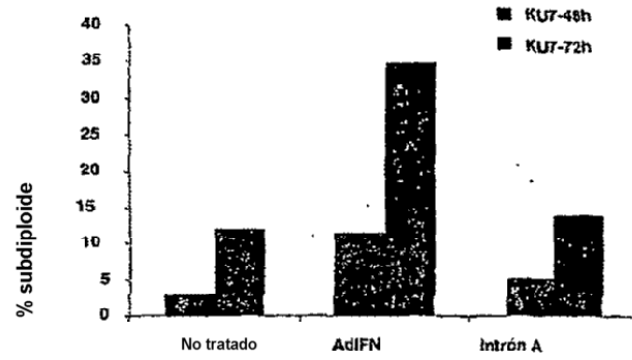


Figura 4

A



B



C

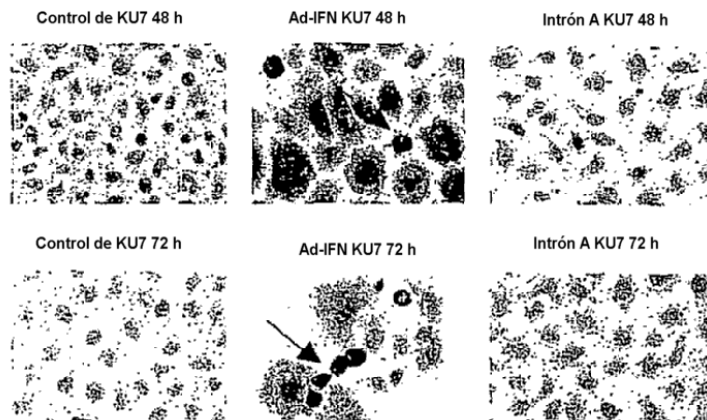


Figura 5