



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 513**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97940569 .3**

96 Fecha de presentación : **15.08.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0957941**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.1999**

54 Título: **Uso de un gen asociado a la diferenciación del melanoma (mda-7) para invertir un fenotipo canceroso.**

30 Prioridad: **16.08.1996 US 696573**

73 Titular/es: **The Trustees of Columbia University  
in the City of New York  
Broadway And West 116th Street  
New York, New York 10027-6699, US**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.09.2011**

72 Inventor/es: **Fisher, Paul, B.**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.09.2011**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 364 513 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de un gen asociado a la diferenciación del melanoma (*mda-7*) para invertir un fenotipo canceroso

5 La presente solicitud es una solicitud de continuación en parte de la solicitud de EE.UU. nº de serie 08/696.573 presentada el 16 de junio de 1996, cuyo contenido se incorpora en la presente solicitud por referencia.

La invención desvelada en este documento se hizo con la financiación del gobierno bajo la subvención del NCI/NIH nº CA35675 del Departamento de Salud y Servicios Humanos. Por consiguiente, el gobierno de EE.UU. tiene ciertos  
10 derechos en la presente invención.

En toda la presente solicitud, diversas referencias se citan dentro de paréntesis. Las divulgaciones de estas publicaciones se incorporan en sus totalidades por este documento por referencia en la presente solicitud para describir más completamente el estado de la materia al que se refiere la presente invención. La mención  
15 bibliográfica completa de estas referencias puede encontrarse al final de cada serie de experimentos.

**Antecedentes de la invención**

El cáncer es un complejo proceso de múltiples factores y múltiples etapas que implica la expresión coordinada y la  
20 supresión de genes que funcionan de reguladores positivos y negativos de la oncogénesis (1-5). Las estrategias de clonación directa basadas en la transferencia de un fenotipo transformante dominante o tumorigénico han identificado oncogenes de acción positiva (6-9). A diferencia, la detección y la clonación de genes que suprimen el fenotipo del cáncer han demostrado ser más difíciles y escurridizas (10-15). Un enfoque directo para aislar genes directamente implicados en la regulación del crecimiento y la diferenciación implica hibridación sustractiva entre  
25 bibliotecas de ADNc construidas a partir de células cancerosas activamente en crecimiento y bibliotecas de ADNc de células cancerosas inducidas para perder la capacidad proliferativa irreversiblemente y para diferenciarse terminalmente (13,14). Esta estrategia experimental se ha aplicado a células de melanoma humano inducidas para diferenciarse terminalmente mediante el tratamiento con interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) recombinante humano y mezereína (MEZ), produciendo la clonación de novedosos genes asociados a la diferenciación del melanoma (*mda*) no  
30 previamente descritos en bases de datos de ADN (13,14). Una función directa para los genes *mda* específicos en la mediación del control del crecimiento y el ciclo celular es evidente mediante la identificación y la clonación de *mda-6* (13-16), que es idéntico al inhibidor ubicuo de cinasas dependientes de ciclinas p21 (17). La importancia de p21 en el control del crecimiento está muy bien documentada y este gen ha sido aislado independientemente, como WAF-1, CIP-1 y SDI-1, por varios laboratorios usando diferentes enfoques (18-20). Estos estudios indican que los genes  
35 específicos asociados al control proliferativo son inducidos y pueden contribuir a los procesos de detención del crecimiento y diferenciación terminal en células cancerosas humanas.

El gen *mda-7* se clonó a partir de una biblioteca sustractiva de melanoma humano (HO-1) tratado con un inductor de la diferenciación (IFN- $\beta$  más MEZ) (13,14). El ADNc de *mda-7* tiene 1718 nucleótidos, y el principal marco de lectura  
40 abierto codifica una proteína novedosa de 206 aa con un M<sub>r</sub> de 23,8 kDa (21). Estudios previos indican que *mda-7* se induce en función de la detención del crecimiento y la inducción de la diferenciación terminal en células de melanoma humano (14,21). La expresión de *mda-7* también establece inversamente una correlación con la progresión de melanoma, es decir, melanocitos humanos normales que crecen activamente expresan más *mda-7* que células de melanoma humano metastásico (21). Además, el *mda-7* es inhibidor del crecimiento hacia células de  
45 melanoma humano en ensayos de transfección transitoria y en células transformadas estables que contienen un gen *mda-7* inducible por dexametasona (DEX) (21). Estos estudios indican que *mda-7* puede contribuir a la fisiología de melanocitos y melanomas humanos, y este gen tiene propiedades supresoras del crecimiento cuando se expresa en exceso en células de melanoma humano.

50 El gen *mda-7* también se describió en la solicitud de Tratado de Cooperación de Patente internacional nº PCT/US94/12160, fecha de presentación internacional, 24 de octubre de 1994 con publicación internacional nº WO95/11986, cuyo contenido se incorpora en la presente solicitud por referencia.

La presente invención informa que *mda-7* es un potente gen supresor del crecimiento en células cancerosas de  
55 diverso origen que incluye mama, sistema nervioso central, cuello del útero, colon, próstata y tejido conjuntivo. Una inhibición en la formación de colonias se produce en células cancerosas que contienen defectos en sus genes p53 y/o de retinoblastoma (RB) o que carecen de la expresión de p53 y de RB. A diferencia, la expresión de *mda-7* en células epiteliales mamarias humanas normales, fibroblastos de la piel humana y fibroblastos de embrión de rata induce cuantitativamente menos supresión del crecimiento que en células cancerosas. Cuando se expresa  
60 establemente en células de carcinoma de cuello del útero humano (HeLa) y de carcinoma de próstata (DU-145), *mda-7* tiene un efecto negativo sobre las propiedades relacionadas con el crecimiento y la transformación. Los efectos de *mda-7* sobre células HeLa son reversibles tras la derogación de la proteína MDA-7 mediante infección con un vector Ad5 genéticamente modificado que expresa un gen *mda-7* antisentido. Estas observaciones indican que *mda-7* es un novedoso gen supresor del crecimiento con una amplia gama de acciones inhibitorias en cánceres  
65 humanos que manifiestan diferentes defectos genéticos.

**Resumen de la invención**

La presente invención proporciona un procedimiento para invertir el fenotipo canceroso de una célula cancerosa introduciendo un ácido nucleico que incluye un gen asociado a la diferenciación del melanoma (*mda-7*) en la célula  
 5 en condiciones que permitan la expresión del gen de manera que así se invierta el fenotipo canceroso de la célula. La presente invención también proporciona un procedimiento para invertir el fenotipo canceroso de célula cancerosa en un sujeto introduciendo el ácido nucleico anteriormente descrito en la célula cancerosa del sujeto.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que tiene una cantidad de un ácido  
 10 nucleico que incluye un gen asociado a la diferenciación del melanoma (*mda-7*) eficaz para invertir el fenotipo canceroso de una célula cancerosa y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

**Breve descripción de las figuras**

15 **Figura 1.** Efecto de la expresión de *mda-7* sobre la formación de colonias resistentes a higromicina en células HeLa. Las células HeLa se transfectaron con 10 µg de vector pREP4 (vector del RSV), *mda-7* se clonó en una orientación antisentido en el vector pREP4 (RSV-MDA-7-antisentido), o *mda-7* se clonó en una orientación sentido en el vector pREP4 (RSV-MDA-7-sentido) y se seleccionó en medios que contenían 100 µg de higromicina.

20 **Figura 2.** Efecto de *mda-7* antisentido sobre el crecimiento en monocapa de HeLa cl 1 del vector pREP4 y células HeLa cl 2 que expresan *mda-7* (S). Se cultivaron células HeLa cl 1 (clon de HeLa transformado con el vector pREP4) y HeLa cl 2 (clon de HeLa que expresa *mda-7*) en ausencia o tras la infección con 10 unidades formadoras de placa/célula con un adenovirus de tipo 5 recombinante (Ad5) que expresa *mda-7* antisentido [Ad.*mda-7* (AS)]. Los resultados son el número de células promedio de muestras por triplicado que variaron ≤ 10%.

25 **Figura 3.** Efecto de *mda-7* antisentido sobre la proteína complejante MDA-7 de alto peso molecular (HMC), la proteína MDA-7 y la proteína actina en células HeLa, HeLa cl 1 y HeLa cl 2. HeLa y HeLa cl 1 (clon de HeLa transformado con el vector pREP4) estaban sin infectar (-) o infectadas (+) con 10 unidades formadoras de placa/célula de Ad.*mda-7* (AS) durante 96 h marcado con [<sup>35</sup>S]-metionina, y los niveles de las proteínas HMC, MDA-7 y actina se determinaron por análisis de inmunoprecipitación. Para HeLa cl 2 (clon de HeLa que expresa *mda-7*), el efecto de la infección con 10 unidades formadoras de placa/ml de Ad.*mda-7* (AS) sobre los niveles de proteína se determinó por análisis de inmunoprecipitación de lisados celulares marcados con [<sup>35</sup>S]-metionina después de +24, +48, +72 y +96 h. El efecto de la infección de células HeLa cl 2 con Ad5 mutante de control, H5dl 434, se determinó por análisis de inmunoprecipitación de lisados celulares marcados con [<sup>35</sup>S]-metionina 96 h después de la infección  
 30 con 10 unidades formadoras de placa/célula.  
 35

**Figuras 4A y 4B** Síntesis de ARN de *mda-7* y proteína en clones de DU-145 que contienen un gen *mda-7* inducible por DEX.

40 **Figura 4A.** Las células se cultivaron en ausencia o presencia de DEX 10<sup>-6</sup> M durante 96 h y se aisló el ARN total, se sometieron a transferencia Northern y se sondaron con *mda-7*, un gen de resistencia a neomicina (Neo<sup>R</sup>) y GAPDH.

**Figura 4B.** Las células se cultivaron en ausencia o presencia de DEX 10<sup>-6</sup> M durante 96 h, las proteínas celulares se marcaron con (<sup>35</sup>S)-metionina y se inmunoprecipitaron con anticuerpos que reconocían las proteínas MDA-7 y actina.  
 45

**Figura 5** Inhibición de crecimiento de xenoinjertos de cáncer de cuello del útero humano establecido (HeLa) en ratones atímicos sin pelo.

**Figura 6** Efecto de Ad.*mda-7* S sobre las relaciones del volumen tumoral de HeLa. El resultado indica que Ad.*mda-7* S pueden inhibir la progresión tumoral *in vivo* en ratones sin pelo.  
 50

**Descripción detallada de la invención**

Con el fin de facilitar un entendimiento de la sección Detalles experimentales que sigue, ciertos procedimientos y/o  
 55 términos que se producen frecuentemente se describen en Sambrook y col. (45).

La presente invención proporciona un procedimiento para invertir el fenotipo canceroso de una célula cancerosa que comprende introducir un ácido nucleico que comprende un gen asociado a la diferenciación del melanoma (*mda-7*) en la célula en condiciones que permitan la expresión del gen de manera que así se invierta el fenotipo canceroso  
 60 de la célula.

La presente invención también proporciona un procedimiento para invertir el fenotipo canceroso de una célula cancerosa en un sujeto que comprende introducir una molécula de ácido nucleico que comprende un gen asociado a la diferenciación del melanoma (*mda-7*) en la célula cancerosa del sujeto en condiciones que permitan la expresión del gen en las células del sujeto de manera que así se invierta el fenotipo canceroso de la célula.  
 65

Los procedimientos para introducir una molécula de ácido nucleico en células son muy conocidos en la técnica. Una molécula desnuda de ácido nucleico puede introducirse en la célula por transformación directa. Alternativamente, la molécula de ácido nucleico puede incorporarse en liposomas. Por consiguiente, la presente invención proporciona los procedimientos anteriores en los que el ácido nucleico se introduce en las células por tecnología de ADN

5 desnudo, vector de adenovirus, vector de virus adenoasociado, vector del virus de Epstein-Barr, vector del virus del herpes, vector del VIH atenuado, vectores retrovíricos, vector del virus vaccinia, liposomas, liposomas recubiertos de anticuerpos, medios mecánicos o eléctricos. Los procedimientos anteriormente citados sirven meramente de ejemplos de medios factibles de introducción del ácido nucleico en células. Otros procedimientos conocidos también puede usarse en la presente invención.

10

En una realización de los procedimientos anteriores, el gen asociado a la diferenciación del melanoma (*mda-7*) está ligado a un elemento regulador de forma que su expresión está bajo el control del elemento regulador. En todavía otra realización, el elemento regulador es inducible o constitutivo. El elemento regulador inducible como un promotor inducible se conoce en la técnica. En la técnica también se conoce el elemento regulador tal como el promotor que

15

En una realización separada, el elemento regulador es un elemento regulador específico de tejido. La expresión del gen *mda-7* será entonces específica de tejido.

20 En otra realización de los procedimientos anteriormente descritos, la célula cancerosa se caracteriza por la presencia dentro de la célula cancerosa de un gen supresor del tumor defectuoso. El gen supresor del tumor defectuoso incluye, pero no se limita a, un gen p53, de retinoblastoma (RB) o p16<sup>ink4a</sup>.

En una realización de los procedimientos anteriormente descritos, la célula cancerosa se caracteriza por la presencia dentro de la célula cancerosa de un oncogén de acción dominante. Específicamente, el oncogén de acción dominante puede ser un gen Ha-ras, p53 mutante o del virus del papiloma humano. El Ha-ras es un oncogén ras del virus de Harvey.

25

En una realización de los procedimientos anteriores, el ácido nucleico comprende un vector. El vector incluye, pero no se limita a, un vector de adenovirus, vector de virus adenoasociado, vector del virus de Epstein-Barr, vector del virus del herpes, vector del VIH atenuado, vector de retrovirus y vector del virus vaccinia. En una realización preferida, el vector de adenovirus es un vector de adenovirus defectuoso en la replicación que expresa *mda-7*, designado Ad.*mda-7* S.

30

En una realización de los procedimientos anteriormente descritos, la célula cancerosa incluye, pero no se limita a, un tejido de mama, de cuello del útero, de colon, de próstata, nasofaríngeo, de pulmón, conjuntivo.

35

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un ácido nucleico que comprende un gen asociado a la diferenciación del melanoma (*mda-7*) eficaz para invertir el fenotipo canceroso de una célula cancerosa y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40

Como se usa en este documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" engloba cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales. La composición farmacéutica puede estar constituida en cualquier forma adecuada para el modo de administración seleccionado. Composiciones adecuadas para administración por vía oral incluyen formas sólidas tales como píldoras, cápsulas, gránulos, comprimidos y polvos, y formas líquidas tales como disoluciones, jarabes, elixires y suspensiones. Formas útiles para administración parenteral incluyen disoluciones estériles, emulsiones y suspensiones.

45

En una realización, el ácido nucleico comprende un vector. El vector incluye, pero no se limita a, un vector de adenovirus, vector de virus adenoasociado, vector del virus de Epstein-Barr, vector del virus del herpes, virus del VIH atenuado, vector de retrovirus y vector del virus vaccinia. En una realización preferida, el vector de adenovirus es un vector de adenovirus defectuoso en la replicación que expresa *mda-7*, designado Ad.*mda-7* S. En otra realización, el adenovirus es un vector de adenovirus competente en la replicación.

50

En una realización de los procedimientos anteriormente descritos, la célula cancerosa incluye, pero no se limita a, un tejido de mama, de cuello del útero, de colon, de próstata, nasofaríngeo, de pulmón, conjuntivo.

55

La presente invención se entenderá mejor a partir de los siguientes detalles experimentales. Sin embargo, un experto en la materia apreciará fácilmente que los procedimientos y resultados específicos tratados son meramente ilustrativos de la invención ya que se describen más completamente en las reivindicaciones que siguen más adelante.

60

### **Detalles experimentales**

65 El cáncer es una enfermedad caracterizada por defectos en el control del crecimiento, y las células tumorales muestran frecuentemente patrones anómalos de diferenciación celular. La combinación de interferón de fibroblasto

humano recombinante y el agente antileucémico mezereína corrige estas anomalías en células de melanoma humano cultivadas produciendo la detención irreversible del crecimiento y la diferenciación terminal. La hibridación sustractiva identifica un gen asociado a la diferenciación del melanoma (*mda-7*) con elevada expresión en las células de melanoma humano de crecimiento detenido y terminalmente diferenciadas. La formación de colonias disminuye cuando *mda-7* se transfecta en células tumorales humanas de diverso origen y con múltiples defectos genéticos. A diferencia, los efectos de *mda-7* sobre el crecimiento y la formación de colonias en ensayos de transfección transitoria con células normales, que incluyen epitelio mamario humano, fibroblasto de piel humana y fibroblasto de embrión de rata, son cuantitativamente inferiores a los encontrados con células cancerosas. Las células tumorales que expresan elevado *mda-7* muestran una supresión en el crecimiento en monocapa e independencia del anclaje. La infección con un adenovirus de tipo 5 recombinante que expresa *mda-7* antisentido elimina la supresión de *mda-7* del crecimiento *in vitro* y fenotipo transformado. La capacidad de *mda-7* para suprimir el crecimiento en células cancerosas que no se expresan o que contienen defectos en tanto los genes de retinoblastoma (RB) como p53 indica una falta de implicación de estos elementos supresores de tumores críticos en la mediación de la inhibición del crecimiento inducida por *mda-7*. La falta de homología con proteínas de *mda-7* con los genes supresores del crecimiento previamente descritos y el efecto diferencial de este gen sobre células normales frente a cancerosas sugiere que *mda-7* puede representar una nueva clase de genes supresores del crecimiento del cáncer con actividad antitumoral.

## MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

**Líneas celulares y condiciones de cultivo.** Las líneas celulares de carcinoma humano, que incluyen MCF-7 y T47D (mama), LS174T y SW480 (colorrectal), HeLa (de cuello del útero), DU-145 (próstata) y HONE-1 (nasofaríngeo) (9,22-25), se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero bovino fetal al 10% (DMEM-10) a 37°C en una estufa de incubación humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire. Tipos de células humanas adicionales que incluyen HBL-100 (epitelio mamario normal), HO-1 y C8161 (melanoma), GBM-18 y T98G (glioblastoma multiforme) y Saos-2 (osteosarcoma humano) se mantuvieron bajo condiciones similares. Las células epiteliales mamarias humanas de pases tempranos (HMEC; pases 10-12) se obtuvieron de Clonetics Corporation (San Diego, CA). Las células HMEC se mantuvieron en medio sin suero como se describe por Clonetics Corporation. CREF-Trans 6 (fibroblasto de embrión de rata Fischer clonado) (9,26) y CREF Ha-ras (células CREF transformadas por el oncogén Ha-ras (T24)) (27) se cultivaron en DMEM-5. HeLa cl 1 es un clon de HeLa transformado con el vector del virus del sarcoma de Rous RSV resistente a higromicina (Hyg<sup>R</sup>) (pREP4) (Invitrogen). HeLa cl 2 es un clon de HeLa que expresa Hyg<sup>R</sup> *mda-7*. Las células HeLa cl 1 y HeLa cl 2 se construyeron como se ha descrito (12,21) y se mantuvieron en DMEM-10 que contiene 100 µg/ml de higromicina. Las células DU-145 cl 6 y DU-145 cl 7 contienen un gen *mda-7* inducible por DEX (clonado en un vector pMAMneo) (Clontech) (21) y se mantienen en DMEM-10 que contiene 200 µg/ml de G418.

**Hibridación sustractiva, plásmidos, construcciones de vectores de expresión e hibridación Northern.** La identificación y la clonación de *mda-7* por hibridación sustractiva se logró como se ha descrito (13). Un ADNc de *mda-7* de longitud completa se aisló cribando una biblioteca de ADNc recombinante HO-1 tratada con IFN-β más MEZ (13) y usando el procedimiento de amplificación rápida de extremos de ADNc como se ha descrito (15). Un fragmento de ADNc de *mda-7* (posición de nucleótidos 176-960) que contiene el marco de lectura abierto se amplificó con PCR y se clonó en pCRII<sup>™</sup> (Invitrogen) por clonación TA. La orientación de los insertos en los vectores se determinó por mapeo de restricción. Las construcciones de expresión de células humanas se prepararon clonando fragmentos *Kpn I* - *Xho I* de los vectores de PCR<sup>™</sup> en el vector pREP4 (Invitrogen) en la dirección 3' de un promotor del RSV en una orientación sentido [*mda-7* (S)] o antisentido [*mda-7* (AS)]. Alternativamente, el fragmento del gen *mda-7* se clonó en el vector pMAMneo (Clontech) en una orientación sentido y antisentido. El aislamiento de ARN y la transferencia Northern se realizaron como se ha descrito (9,12,13,21).

**Ensayos de crecimiento en monocapa, independencia del anclaje y transfección de ADN.** Los ensayos de crecimiento en monocapa e independiente del anclaje se realizaron como se describe previamente (8,12,26). Para estudiar el efecto de *mda-7* sobre la formación de colonias de monocapa, el vector [pREP4 (RSV)] que no contiene inserto, construcciones de expresión de *mda-7* (S) o *mda-7* (AS) se transfectaron en los diversos tipos de células por el procedimiento de lipofectamina (GIBCO/BRL) y se determinó la formación de colonias resistentes a higromicina o el crecimiento celular en higromicina (12,21).

**Construcción del vector de adenovirus *mda-7* antisentido.** El Ad.*mda-7* (AS) defectuoso en la replicación recombinante se creó en dos etapas. Primera, la secuencia codificante del gen *mda-7* se clonó en un vector de expresión de Ad modificado pAd.CMV (28). Éste contiene, en orden, los primeros 355 pb desde el extremo izquierdo del genoma de Ad, el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), ADN que codifica sitios de donante y receptor de corte y empalme, sitios de clonación para el gen deseado (en este caso *mda-7*), ADN que codifica una secuencia señal polyA del gen de beta-globina y aproximadamente 3 kpb de la secuencia de adenovirus que se extiende desde dentro de la región codificante E1B. Esta disposición permite un alto nivel expresión de la secuencia clonada por el promotor del gen temprano inmediato del CMV, y el procesamiento apropiado de ARN (28). El virus recombinante se creó *in vivo* en células 293 (29) mediante recombinación homóloga entre el vector que contiene *mda-7* y el plásmido JM17, que contiene el genoma del Ad completo clonado en una versión modificada de pBR322 (30). JM17 da lugar a genomas de Ad *in vivo*, pero son demasiado largos para encapsidarse. Esta disposición es

rota por la recombinación con el vector para crear un genoma encapsidable (30) que contiene el gen de elección. El virus recombinante es defectuoso en la replicación en células humanas, excepto en células 293, que expresan el adenovirus E1A y E1B. Tras la transfección de los dos plásmidos, el virus infeccioso se recuperó, los genomas se analizaron para confirmar la estructura recombinante y entonces el virus se purificó en placa, todo por 5 procedimientos convencionales (31).

**Producción de anticuerpos de péptido y análisis de inmunoprecipitación.** Se prepararon anticuerpos de péptido contra PSQENEMFSIRD como se ha descrito (21). Las células HeLa, HeLa cl 1 (clon de HeLa de control del vector Hyg<sup>R</sup> pREP4) y HeLa cl 2 [clon de HeLa que expresa Hyg<sup>R</sup> *mda-7* transfectado con pREP4-*mda-7* (S)] de 10 crecimiento logarítmico estuvieron tanto sin tratar como infectadas con 10 unidades formadoras de placa de adenovirus de control (H5d1434) (32) o un adenovirus recombinante que expresaba *mda-7* (AS) [Ad.*mda-7* (AS)]. En diversos momentos después de la infección, los cultivos se privaron de metionina durante 1 h a 37°C en medio sin metionina, las células se concentraron por centrifugación y se marcaron durante 4 h a 37°C en 1 ml del mismo medio con 100 µCi (1 Ci=37 gBq) de <sup>35</sup>S (NEN; Express <sup>35</sup>S). Los análisis de inmunoprecipitación con 2 µg de anticuerpo 15 policlonal de conejo de péptido de *MDA-7* o anticuerpo monoclonal de actina (Oncogene Sciences) se realizaron como se ha descrito (15,21).

## RESULTADOS EXPERIMENTALES

20 **Propiedades inhibitorias del crecimiento potenciado de *mda-7* en células cancerosas humanas y células de fibroblasto de embrión de rata transformadas por Ha-ras.** Los ensayos de transfección de ADN se realizaron para evaluar el efecto de la elevada expresión de *mda-7* sobre el crecimiento celular. Cuando se transfectaron en células de carcinoma de cuello del útero humano (HeLa), la construcción de *mda-7* (S) produce una reducción de 10 a 15 veces la reducción en colonias Hyg<sup>R</sup> en comparación con los cultivos transfectados con el vector pREP4 y la 25 construcción de *mda-7* (AS) (Fig. 1 y Tabla 1).

Tabla 1 Efecto de *mda-7* sobre la formación de colonias en monocapa de células de cáncer humano, de fibroblastos de embrión de rata normal (CREF) y CREF transformadas con Ha-ras.

Tipo de célula	Vector del RSV <sup>a</sup>	RSV- <i>mda-7</i> (S) <sup>b</sup>	RSV- <i>mda-7</i> (AS)
Líneas de células cancerosas humanas <sup>c</sup>			
MCF-7 (Ca de mama)	118 ± 24	42 ± 16 (3,5)	146 ± 20
T47D (Ca de mama)	172 ± 9	44 ± 7 (4,2)	186 ± 28
HeLa (Ca de cuello del útero)	1571 ± 446	117±107 (15,2)	1771 ± 385
LS174T (Ca colorrectal)	130 ± 14	30 ± 3 (5,4)	160 ± 15
HONE-1 (Ca nasofaríngeo)	219 ± 19	71±8 (3,5)	250 ± 19
DU-145 (Ca de próstata)	174 ± 18	54 ± 8 (3,1)	166 ± 12
T98G (glioblastoma)	99 ± 9	32 ± 4 (3,6)	115 ± 14
Saos-2 (Osteosarcoma)	126 ± 22	35 ± 6 (3,9)	138 ± 14
Fibroblasto de embrión de rata			
CREF (embrión de rata normal)	60 ± 10	35 ± 5 (1,7)	66 ± 7
CREF-ras (transformado)	147 ± 16	25 ± 4 (6,0)	151 ± 16

<sup>a</sup> Se sembraron células de crecimiento logarítmico a  $1 \times 10^6$  por placa de 100 mm y se transfectaron con 10 µg de vector [pREP4 (RSV) ] que no contenía inserto, *mda-7* (S) o *mda-7* (AS). Después de 24 h, las células se volvieron a sembrar en placa a aproximadamente  $2 \times 10^5$  células por placa de 100 mm en medio que contenía 100 µg/ml de higromicina. El medio se cambió cada 3 o 4 días y las placas se fijaron en formaldehído y se tiñeron con Giemsa en el día 14 o 21. Las colonias que contenían 50 o más células se enumeraron. Los valores mostrados son las colonias promedio de Hyg<sup>R</sup> formadas en cuatro a cinco placas duplicadas ± D.E.

<sup>b</sup> Los valores entre paréntesis indican la disminución en veces en la formación de colonias frente a células transfectadas con RSV-*mda-7* (AS).

<sup>c</sup> MCF-7, T47D, HeLa, LS174T, DU-145 y HONE-1 son líneas de células de carcinoma humano (Ca) aisladas del sitio anatómico indicado. T98G es una línea celular de glioblastoma multiforme humano. CREF-ras es un clon de CREF transformado con el oncogén Ha-ras (T24).

30

Además de formar menos colonias, las colonias de *mda-7* (S) son generalmente más pequeñas en tamaño que la colonias de Hyg<sup>R</sup> correspondientes resultantes después de la transfección con el vector pREP4 o construcciones de *mda-7* (AS) (Fig. 1). Cuando se transfectan en líneas de células cancerosas humanas adicionales, las construcciones de *mda-7* (S) reducen de 3 a 10 veces la formación de colonias de Hyg<sup>R</sup> (Tabla 1). Éstas incluyen 35 carcinoma de mama humano (MCF-7 y T47D), carcinoma de colon (LS174T y SW480), carcinoma nasofaríngeo (HONE-1), carcinoma de próstata (DU-145), melanoma (HO-1 y C8161), glioblastoma multiforme (GBM-18 y T98G) y osteosarcoma (Saos-2). Como se observa con células HeLa, los tamaños promedio de colonias de Hyg<sup>R</sup> que se

forman después de la transfección con construcciones de *mda-7* (S) son más pequeños que los formados tras la transfección con el vector vacío pREP4 o construcciones de *mda-7* (AS). Estos resultados demuestran que *mda-7* es un gen supresor del crecimiento potente cuando se expresa en exceso en un amplio espectro de cánceres humanos histológicamente distintos. Para determinar si *mda-7* también inhibe el crecimiento de células normales y si este efecto es cuantitativamente similar al observado con células cancerosas humanas se realizaron ensayos de transfección de ADN transitorio con células epiteliales mamarias humanas normales (HMEC) del pase de 10 a 12, la línea de células epiteliales de mama normal HBL-100, fibroblastos de piel humana normal (pase 21) y una línea de células de fibroblasto de embrión de rata normal clonada (CREF-Trans 6) (7,8). Como HMEC, HBL-100 y los fibroblastos de la piel humana normal no forman colonias bien definidas a altas frecuencias, incluso cuando se usa una capa de alimentación, el efecto se determinó sobre el número total de células después de la transfección con las diferentes construcciones de RSV y el crecimiento durante dos y tres semanas en higromicina. Usando este enfoque se observó una disminución aproximada de 1,1 a 1,6 veces en HMEC, una disminución aproximada de 1,1 a 1,2 veces en HBL-100 y una disminución aproximada de 1,3 a 2,1 veces en el número de células de fibroblastos de piel humana normal (tres experimentos independientes con cada tipo de célula) en *mda-7* (S) frente a *mda-7* (AS) o células normales transfectadas con el vector pREP4, respectivamente. A diferencia, usando un protocolo experimental similar con células de carcinoma de mama humano T47D, el crecimiento se inhibió tras la transfección con la construcción de *mda-7* (S) aproximadamente 3,2 a 5,2 veces en comparación con células transfectadas con vector y antisentido. En el caso de células CREF-Trans 6, la diferencia en la formación de colonias de Hyg<sup>R</sup> durante seis ensayos de transfección independientes entre *mda-7* (S) frente a *mda-7* (AS) y células transfectadas con vector osciló de 0,5 a 2,8 veces (Tabla 1). A diferencia, la transfección de construcciones de *mda-7* (S) en células CREF transformadas con Ha-ras redujo la formación de colonias ~6 a 8 veces (Tabla 1). Estos resultados indican que *mda-7* es cuantitativamente menos eficaz en la reducción del crecimiento y la formación de colonias en células humanas normales y de roedor normales que en células de cáncer en humano y de embrión de rata transformadas con Ha-ras.

**Efecto de la expresión de *mda-7* estable e inducible e inhibición antisentido de la expresión de *mda-7* sobre el crecimiento celular y el fenotipo transformado.** Para determinar el motivo de la supervivencia de células HeLa a baja frecuencia después de la transfección con el gen *mda-7* (S), diez colonias de Hyg<sup>R</sup> independientes se aislaron tras la transfección con la construcción de *mda-7* (S). De los 10 clones analizados por transferencia Northern para la expresión de *mda-7*, 7 clones no expresaron ARNm de *mda-7* detectable, 2 clones expresaron bajos niveles de ARNm de *mda-7* y 1 clon (designado HeLa cl 2) mostró altos niveles de ARNm de *mda-7*. A diferencia, todos los clones mostraron niveles comparables de Hyg<sup>R</sup> y expresión génica de gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH). Cuando se compararon con células HeLa parentales o un clon de HeLa del vector pREP4 (designado HeLa cl 1), las células HeLa cl 2 (que expresa *mda-7*) crecieron a una tasa reducida (Fig. 2). Cuando crecieron en agar, las células HeLa y HeLa cl 1 sin clonar crecieron con aproximadamente el 42% de eficiencia, mientras que las células HeLa cl 2 (que expresan *mda-7*) crecieron con aproximadamente el 25% de eficiencia y los tamaños promedio de las colonias fueron más pequeños que los observados con células HeLa parentales y HeLa cl 1 con vector pREP4. Estos resultados indican que la supervivencia de HeLa después de la transfección con *mda-7* resulta principalmente de la falta de o los bajos niveles de expresión de *mda-7*. Sin embargo, en células HeLa que expresan establemente *mda-7* elevado se reducen el crecimiento en cultivo en monocapa y la independencia del anclaje.

Para determinar si la reducción en el crecimiento *in vitro* y la supresión por transformación encontradas en HeLa cl 2 (que expresa *mda-7*) son una consecuencia directa de la expresión de *mda-7* se usó una estrategia antisentido para inhibir directamente la expresión de *mda-7*. Se construyó un vector Ad5 recombinante que contenía el gen *mda-7* clonado en una orientación antisentido [Ad.*mda-7* (AS)]. La infección de HeLa cl 2 (que expresa *mda-7*), pero no HeLa cl 1 (vector pREP4, que no expresa *mda-7*) o HeLa parental, con Ad.*mda-7* (AS) aumenta la tasa de crecimiento y la eficiencia de formación en agar (de aproximadamente el 25 a aproximadamente el 44%) (Fig. 2). A diferencia, el vector Ad5 mutante de control (H5d1434), que no contiene el gen *mda-7*, no afecta el crecimiento en monocapa o en agar de células HeLa, HeLa cl 1 o HeLa cl 2 parentales (datos no mostrados).

Usando anticuerpos de péptido específicos de *mda-7* producidos en conejos y análisis de inmunoprecipitación, las células HeLa cl 2 (que expresan *mda-7*) contienen niveles elevados de la proteína MDA-7 de aproximadamente 24 kDa y una proteína complejante de alto peso molecular (HMC) de aproximadamente 90 a 110 kDa (Fig. 3). La infección con Ad.*mda-7* (AS), pero no el virus que no expresa *mda-7* de control H5d1434, produce una disminución temporal en tanto la proteína MDA-7 de ~24 kDa como la proteína HMC (21) (Fig. 3). Niveles reducidos de ambas proteínas se observan a las 48 h y continúan suprimidos durante un periodo de 96 h después de la infección con Ad.*mda-7* (AS). A diferencia, los niveles de actina continúan inalterados tras la infección vírica. Estos hallazgos indican que la inhibición antisentido de la expresión de la proteína MDA-7 en HeLa cl 2 (que expresa *mda-7*) puede extinguir directamente la supresión y la inhibición del crecimiento inducido por *mda-7* en el crecimiento independiente del anclaje.

Para confirmar el efecto supresor de *mda-7* sobre el crecimiento celular, células de cáncer de próstata humano DU-145 se manipularon por ingeniería para expresar un gen *mda-7* inducible por DEX. Cuando las células DU-145 cl 6 o cl 7 [que contienen un gen *mda-7* (S) inducible por DEX], pero no las células DU-145 parentales, se cultivan durante 24 a 96 h en presencia de DEX 10<sup>-6</sup> M, el ARNm y la proteína de *mda-7* (incluyendo la proteína HMC) se inducen (Fig. 4). A diferencia, DEX no altera la expresión génica de resistencia a neomicina (Neo<sup>R</sup>) en células DU-145 cl 6 y

cl 7 o la expresión de GAPDH en cualquiera de las células probadas (Fig. 4). La inducción de la expresión de *mda-7* en células DU-145 cl 6 y cl 7 por el crecimiento en DEX  $10^{-6}$  M produce aproximadamente el 50% de reducción en el número de células después de 96 h frente al crecimiento en ausencia de DEX. A diferencia, no se produce inhibición significativa del crecimiento cuando las células DU-145 parentales o las células DU-145 transformadas con el vector pMAMneo se cultivan durante 96 h en medio que contiene DEX  $10^{-6}$  M (datos no mostrados). Estos datos indican que la expresión ectópica de *mda-7* puede alterar directamente el crecimiento celular en células de cáncer de próstata.

## DISCUSIÓN EXPERIMENTAL

10

La hibridación sustractiva identificó genes *mda* con elevada expresión en células de melanoma humano de crecimiento detenido y terminalmente diferenciadas (13,14,21). La determinación de la función de estos genes *mda* será primordial en la definición de la base molecular del control del crecimiento y la diferenciación terminal en melanoma humano y otros tipos de células. Se muestra ahora que el gen *mda-7* (14,21) es un gen supresor ubicuo del crecimiento cuando se expresa transitoria o establemente en una amplia matriz de líneas de células cancerosas humanas. Este hallazgo extiende observaciones previas que indican propiedades inhibitorias del crecimiento de la proteína MDA-7 en células de melanoma humano (21). A diferencia de sus efectos sobre las células cancerosas, la transfección de *mda-7* en células epiteliales mamarias humanas normales, células de fibroblastos de piel humanos normales y fibroblastos de embrión de rata normal produce cuantitativamente menos supresión del crecimiento. Al igual que otro gen *mda*, *mda-6* (p21), la expresión de *mda-7* también guarda una relación inversa con la progresión de melanoma, con niveles elevados de tanto *mda-6* (p21) como de *mda-7* presentes en melanocitos humanos normales con respecto a células de melanoma humano metastásicas (14-16,21). Como los melanocitos normales todavía conservan la capacidad proliferativa, aunque a una tasa reducida con respecto a las células de melanoma, es posible que tanto *mda-6* (p21) como *mda-7* funcionen de reguladores negativos del fenotipo de progresión en células del linaje de melanocito/melanoma (14-16,21). Además, la elevada expresión de tanto *mda-6* (p21) como *mda-7* en células de melanoma humano terminalmente diferenciadas y de crecimiento irreversiblemente detenido sugiere que estos genes también pueden ser importantes reguladores del fenotipo de diferenciación terminal (13-16,21).

30

Actualmente no se conoce el mecanismo por el que *mda-7* provoca sus efectos supresores del crecimiento sobre células cancerosas humanas. La estructura de *mda-7* no proporciona la oportunidad de ver la posible función ya que no están presentes motivos de secuencia que sugerirían un posible modo de acción. El efecto de *mda-7* sobre el crecimiento celular puede distinguirse del gen supresor de tumores ampliamente estudiado p53 (33,34). La expresión transitoria de p53 en la línea de células de carcinoma de mama humano T47D que contiene p53 mutante produce la supresión del crecimiento, mientras que la transfección de un gen p53 natural en la línea de células de carcinoma de mama humano MCF-7 que contiene p53 natural no induce la inhibición del crecimiento (34). A diferencia, *mda-7* induce una supresión del crecimiento similar en tanto células T47D como MCF-7 (Tabla 1). La inhibición del crecimiento por *mda-7* también puede desvincularse de la observada con el gen de retinoblastoma (pRb), el gen p107 asociado a pRb y el gen supresor de tumores putativo p16<sup>ink4</sup> (25,35). La expresión en exceso de pRb y p107 inhibe la proliferación celular en tipos de células específicas y en un modo dependiente del ciclo celular (35-37). La transfección de pRb o p107 en la línea celular de glioblastoma humano T98G que contiene un gen de RB aparentemente normal (25) no induce la supresión del crecimiento (35,37), mientras que la expresión transitoria de *mda-7* (S) reduce la formación de colonias T98G (Tabla 1). Actualmente, el efecto inhibitor del crecimiento de *mda-7* no puede distinguirse de la supresión del crecimiento inducida por el miembro de la familia de RB p130/pRb2, que también inhibe la proliferación en células T98G (25). El gen p16<sup>ink4</sup> induce la detención del crecimiento en células que contienen un gen de RB funcional (35,37), mientras que la supresión del crecimiento de *mda-7* se produce en células que contienen genes de RB normales, anómalos o no funcionales. La transfección de *mda-7* en la línea celular de carcinoma de próstata humano DU-145 que contiene un gen de RB mutado (38) y células de osteosarcoma humano Saos-2 que no expresan RB (o p53 natural) produce una inhibición en la formación de colonias (Tabla 1). Similarmente, la inducción de la expresión de *mda-7* en clones DU-145 transformados por *mda-7* inducibles por DEX estables produce la supresión del crecimiento. Estos hallazgos indican una falta de dependencia de un gen de RB funcional para la inhibición del crecimiento por *mda-7*. En conjunto, estos estudios demuestran que el efecto inhibitor de *mda-7* se produce por un mecanismo que es distinto del modo de acción de los dos genes supresores de tumores más ampliamente estudiados, p53 y pRb, y el gen supresor de tumores putativo p16<sup>ink4</sup>.

55

Se han identificado varios genes que muestran elevada expresión en función de la detención del crecimiento o lesión de ADN en células de mamífero (39,40). Tres genes inducibles por detención del crecimiento y lesión de ADN (*gadd*), *gadd45*, *gadd153* y *gadd34*, el gen de respuesta primaria de la diferenciación mielóide estrechamente relacionado (MyD118) (41) y el gen inhibitor de p53 natural mdm-2 (42) están regulados por exceso en células mediante el tratamiento con el agente de lesión de ADN metanosulfonato de metilo (MMS) (40). El gen *gadd45* y específico de la detención del crecimiento (*gas1*) (43,44) se inducen manteniendo las células en confluencia, células privadas de suero o células en crecimiento en bajo suero (40,43,44). A diferencia, la expresión de ARNm de *mda-7* no está inducida en células de melanoma humano tras el tratamiento con metanosulfonato de metilo (MMS) o después de mantener las células en confluencia (21). Además, sólo un pequeño aumento en la expresión del ARNm de *mda-7* se produce en células de melanoma humano HO-1 tras el crecimiento en medio sin suero durante 96 h (21). La diferencia en la regulación de *mda-7* frente a los genes *gadd*, *MyD118* y *gas-1* indica que *mda-7* puede

65



representar una nueva clase de genes de detención del crecimiento.

En resumen, se describe un regulador del crecimiento negativo, *mda-7*, que induce supresión del crecimiento en células cancerosas humanas que contienen genes p53 y de RB tanto normales como mutados. La caracterización de la estructura genómica de *mda-7* será importante en la determinación de si este gen funciona normalmente como un gen supresor de tumores y si las alteraciones están presentes en este gen en células tumorales frente a normales. La identificación de la región promotora de *mda-7* también permitirá un análisis del mecanismo por el que este gen se expresa diferencialmente y es inducible por IFN- $\beta$  más MEZ en tipos de células específicos. Estudios ampliados de posible importancia y de garantía es el hallazgo de que *mda-7* es más inhibidor del crecimiento hacia el cáncer y células transformadas que hacia las células normales. En este contexto, *mda-7* podría demostrar ser útil como parte de un estrategia de intervención basada en genes para la terapia contra el cáncer, en un modo análogo como el gen p53 natural está siendo actualmente probado para la eficacia en la terapia de tumores malignos humanos específicos.

## 15 Referencias

1. Fisher, P.B. (1984) in Tumor Promotion and Cocarcinogenesis in Vitro: Mechanisms of Tumor Promotion, ed. Slaga, T.J., (CRC, Boca Raton, FL), vol. 3, pp. 57-123.
2. Bishop, J.M. (1991). Cell 64, 235-248.
3. Knudson, A.G. (1991). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10914-10921.
4. MacLachlan, T.K., Sang, N. & Giordano, A. (1995). Crit. Rev. Eukaryotic Gene Express. 5, 127-156.
5. Sang, N., Baldi, A. & Giordano, A. (1995). Mol. Cell. Differ. 3, 1-29.
6. Barbacid, M. (1987). Annu. Rev. Biochem. 56, 779-827.
7. Bos, J. (1989). Cancer Res. 49, 4682-4689.
8. Su, Z.-z., Olsson, C.A., Zimmer, S.G. & Fisher, P.B. (1992). Anticancer Res. 12, 297-304.
9. Shen, R., Su, Z.-z., Olsson, C. A. & Fisher, P. B. (1995). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6778-6782.
10. Noda, M., Kitayama, H., Matsuzaki, T., Sugimoto, Y., Okayama, H., Bassin, R. H. & Ikawa, Y. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 162-166.
11. Kitayama, H., Sugimoto, Y., Masuzaki, T., Ikawa, Y. & Noda, M. (1989). Cell 56, 77-84.
12. Lin, J., Su, Z.-z., Grunberger, D., Zimmer, S. G. & Fisher, P. B. (1994). Int. J. Oncol. 5, 5-15.
13. Jiang, H. & Fisher, P. B. (1993). Mol. Cell. Differ. 1, 285-299.
14. Jiang, H., Lin, J. & Fisher, P. B. (1994). Mol. Cell. Differ. 2, 221-239.
15. Jiang, H., Lin, J., Su, Z.-z., Herlyn, M., Kerbel, R. S., Weissman, B. E., Welch, D. R., & Fisher, P. B. (1995) Oncogene 10, 1855-1864.
16. Jiang, H., Lin, J., Su, Z.-z. & Fisher, P. B. (1996). Mol. Cell. Differ. 4, 67-89.
17. Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. & Beach, D. (1993). Nature (London) 366, 701-704.
18. El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1993). Cell 75, 817-825.
19. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. (1993). Cell 75, 805-816.
20. Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M. & Smith, J. R. (1994). Exp. Cell Res. 211, 90-98.
21. Jiang, H., Lin, J. J., Su, Z.-z., Goldstein, N. I. & Fisher, P. B. (1995). Oncogene 11, 2477-2486.
22. Leon, J. A., Mesa-Tejada, R., Gutierrez, M. C., Estabrook, A., Greiner, J. W., Schlom, J. & Fisher, P. B. (1989). Anticancer Res. 9, 1639-1648.
23. Kantor, J., Tran, R., Greiner, G., Pestka, S., Fisher, P. B., Shively, J. E. & Schlom, J. (1989). Cancer Res. 49, 2651-2655.
24. Leon, J. A., Gutierrez, M. C., Jiang, H., Estabrook, A., Waxman, S. & Fisher, P. B. (1992). Cancer Immunol. Immunother. 35, 315-324.
25. Claudio, P. P., Howard, C. M., Baldi, A., De Luca, A., Fu, Y., Condorelli, G., Sun, Y., Colburn, N., Calabretta, B. & Giordano, A. (1994). Cancer Res. 54, 5556-5560.
26. Fisher, P.B., Babiss, L. E., Weinstein, I. B. & Ginsberg, H.S. (1982). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 79, 3527-3531.
27. Boylon, J., Shih, T., Fisher, P. B. & Zimmer, S. G. (1992). Mol. Carcinog. 5, 118-128.
28. Falck-Pedersen, E., Heinflink, M., Alvira, M., Nussenzweig, D.R. & Gershengorn, M.C. (1994). Mol. Pharmacol. 45, 684-689.
29. Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. (1977). J. Gen. Virol. 36, 59-72.
30. McGrory, W.J., Bautista, D.S. & Graham, F.L. (1988). Virology 163, 614-617.
31. Volkert, F.C. & Young, C.S.H. (1983). Virology 125, 175-193.
32. Grodzicker, T. & Klessig, D. (1980). Cell 21, 453-463.
33. Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., Wilson, J.K.V. & Vogelstein, B. (1990). Science 249, 912-915.
34. Mercer, W.E. (1992). Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression 2, 251-263.
35. Medema R. H., Herrera, R. E., Lam F. & Weinberg, R. A. (1995). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6289-6293.
36. Grana, X. & Reddy, E. P. (1995). Oncogene 11, 211-220.
37. Zhu, L., van den Heuvel, S., Helin, K., Fattaey, A., Ewen, M., Livingston, D., Dyson, N. & Harlow, E. (1993). Genes & Dev. 7, 1111-1125.
38. Bookstein, R., Shew, J. Y., Chen, P. L., Scully, P. & Lee, W. H. (1990). Science 247, 712-715.
39. Fornace, A. J., Jr., Alamo, I. J., Jr. & Hollander, M. C. (1988). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8800-8804.

40. Zhan, Q., Lord, K.A., Alamo, I., Jr., Hollander, M.C., Carrier, F., Ron, D., Kohn, K. W., Hoffman, B., Liebermann, D.A. & Fornace, A. J., Jr. (1994). *Mol. Cell. Biol.* 14, 2361-2371.
41. Abdollahi, A., Lord, A., Hoffman-Liebermann, B. & Liebermann, D. (1991). *Oncogene* 6, 165-167.
42. Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D. & Levine, A. J. (1992). *Cell* 69, 1237-1245.
- 5 43. Schneider, C., King, R.M. & Philipson, L. (1988). *Cell* 54, 787-793.
44. Del Sal, G., Ruaro, M.E., Philipson, L. & Schneider, C. (1992). *Cell* 70, 595-607.
45. Sambrook, J. y col. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

## 10 Segunda serie de experimentos

El gen 7 asociado a la diferenciación del melanoma (*mda-7*) en un adenovirus recombinante inhibe el crecimiento de tumores humanos establecidos en ratones sin pelo

- 15 Estudios previos documentan que la expresión ectópica de *mda-7* en células tumorales humanas de diversos orígenes inhibe el crecimiento, como se documenta por una disminución en la formación de colonias en cultivo en monocapa (Jiang y col., PNAS, 93: 9160-9165, 1996). A diferencia, *mda-7* no altera significativamente el crecimiento de células epiteliales o de fibroblasto humanas normales. Estas observaciones soportan la hipótesis de que *mda-7* es un gen supresor del crecimiento del cáncer ubicuo.

20

La capacidad de *mda-7* para inhibir selectivamente el crecimiento de células cancerosas sugiere que este gen podría proporcionar beneficios terapéuticos en el tratamiento de cánceres humanos. Para explorar esta posibilidad se ha generado un adenovirus defectuoso en la replicación que expresa *mda-7*. Los protocolos fueron similares a los usados para construir un adenovirus que expresa *mda-7* antisentido, Ad.*mda-7* AS (Jiang y col., PNAS, 93: 9160-9165, 1996). El Ad.*mda-7* S recombinante defectuoso en la replicación se produjo en dos etapas. Primera, el gen *mda-7* se clonó en una orientación sentido en un vector de expresión de Ad modificado pAd.CMV. Este virus contiene, en orden, los primeros 355 pb desde el extremo izquierdo del genoma de Ad, el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), ADN que codifica una secuencia señal polyA del gen de beta-globina y aproximadamente 3 kpb de la secuencia de adenovirus que se extiende desde dentro de la región codificante E1B.

- 30 Esta disposición permite un alto nivel expresión de la secuencia clonada por el promotor del gen temprano inmediato del CMV, y el procesamiento apropiado de ARN. El virus recombinante se creó *in vivo* en células 293 mediante recombinación homóloga entre el vector que contiene *mda-7* y JM17, que contiene el genoma del Ad completo clonado en una versión modificada de pBR322. JM17 da lugar a genomas de Ad *in vivo*, pero son demasiado largos para encapsidarse. Esta disposición es rota por la recombinación con el vector para crear un genoma encapsidable que contiene el gen de elección. El virus recombinante es defectuoso en la replicación en células humanas, excepto en 293, que expresan el adenovirus E1A y E1B. Tras la transfección de los dos plásmidos, el virus infeccioso se recuperó, los genomas se analizaron para confirmar la estructura recombinante y entonces el virus se purificó en placa, todo por procedimientos convencionales.

- 40 Como se observa con la transfección con *mda-7*, la infección de diversas líneas de células cancerosas humanas, pero no líneas celulares normales, con Ad.*mda-7* S inhibió el crecimiento. Estos resultados demuestran que este virus retiene propiedades observadas con la construcción de plásmido de *mda-7*. En muchas células cancerosas, que incluyen carcinoma de mama (MCF-7 y T47D), glioblastoma (GBM-18 y T98G) y melanoma (HO-1 y C8161), la infección con Ad.*mda-7* S produjo la inducción de muerte celular programada (apoptosis). Este efecto no se provocó en células normales incluso después de la infección con altas multiplicidades de infección (100 ufp/célula) con Ad.*mda-7* S. En otros tipos de células cancerosas, la supresión del crecimiento (como se indica por una supresión en la formación de colonias en cultivo en monocapa) fue evidente sin indicios de apoptosis, como se indica por los cambios en la morfología nuclear, formación de escaleras nucleosómicas o una reacción TUNEL positiva. Estos resultados indican que el virus de Ad.*mda-7* S puede inhibir selectivamente el crecimiento de células cancerosas humanas *in vitro*. Además, en tipos de células cancerosas específicas, la supresión del crecimiento establece una correlación con inducción de apoptosis. Estas observaciones sugieren que la inhibición en el crecimiento del cáncer inducido por *mda-7* puede producirse por múltiples rutas.

- Se usaron modelos de xenoinjerto de tumor humano en ratón sin pelo para determinar si Ad.*mda-7* S puede inhibir el crecimiento de células cancerosas humanas *in vivo*. Ratones sin pelo atímicos obtenidos de Taconic Labs se inyectaron subcutáneamente con un millón de células de carcinoma de cuello del útero humano (HeLa) en PBS mezcladas con Matrigel (volumen final 0,4 ml; relación de Matrigel con respecto a PBS 1:1). Los tumores se dejaron crecer hasta que alcanzaron un volumen promedio de 100 a 200 mm<sup>3</sup> (10 a 21 días después de la inoculación). Entonces, los ratones se aleatorizaron y se dividieron en dos grupos: Grupo 1: Ad defectuoso en la replicación que carece del gen *mda-7*; virus nulo (nulo); y Grupo 2: Ad.*mda-7* S. El tratamiento consistió en inyecciones intratumorales del nulo o Ad.*mda-7* S (100 µl a 4 sitios/inyección) tres veces a la semana durante 4 semanas. Los tumores se midieron de dos veces a tres veces a la semana con un compás calibrador. Los volúmenes de los tumores se calcularon usando la fórmula:  $\pi/6 \times \text{diámetro mayor} \times (\text{diámetro menor})^2$ . Después de 4 semanas de terapia, los animales se siguieron durante una semana adicional y se sacrificaron. El volumen del tumor final dividido entre el volumen del tumor inicial es igual a la relación de volumen del tumor que se define como una medida de la progresión del cáncer.

65

Durante el transcurso del estudio se inhibió el crecimiento de xenoinjertos de HeLa bien establecidos tratados con Ad.*mda-7* S, mientras que los tumores tratados con el virus nulo continuaron creciendo progresivamente (Figuras 5 y 6). El efecto inhibitor de *mda-7* fue significativo con un valor  $p < 0,05$ . Este estudio se repitió y se obtuvieron 5 resultados similares. Estos datos sugieren que la expresión ectópica de *mda-7* puede proporcionar beneficio terapéutico para el tratamiento de cáncer humano. Los experimentos están ahora en progreso usando tumores de cáncer de mama humano establecido, MCF-7 y T47D, en ratones sin pelo.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un ácido nucleico que comprende un gen asociado a la diferenciación del melanoma (*mda-7*) para la preparación de una composición farmacéutica para invertir el fenotipo canceroso de una célula cancerosa en un sujeto, en el que la célula cancerosa se selecciona del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de cuello del útero, una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer nasofaríngeo, una célula de cáncer de pulmón, una célula de osteosarcoma y una célula de cáncer de tejido conjuntivo.
- 10 2. Una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico que comprende un gen asociado a la diferenciación del melanoma (*mda-7*) en un vector y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el vector es un vector de adenovirus, vector de virus adenoasociado, vector del virus de Epstein-Barr, vector del virus del herpes, vector del VIH atenuado, vector de retrovirus o vector del virus vaccinia.
- 15 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en la que el vector de adenovirus es un vector de adenovirus defectuoso en la replicación que expresa *mda-7*.
4. Uso de un ácido nucleico que comprende un gen asociado a la diferenciación del melanoma (*mda-7*) para la preparación de una composición farmacéutica para suprimir el crecimiento de una célula cancerosa en un sujeto, en el que la célula cancerosa se selecciona del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, un cáncer de cuello del útero, una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer nasofaríngeo, una célula de cáncer de pulmón, una célula de osteosarcoma y una célula de cáncer de tejido conjuntivo.
- 20 5. Uso de un ácido nucleico que comprende un gen asociado a la diferenciación del melanoma (*mda-7*) para la preparación de una composición farmacéutica para inducir apoptosis de una célula cancerosa en un sujeto, en el que la célula cancerosa se selecciona del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de melanoma y una célula de glioblastoma multiforme.
- 25 6. Uso de un ácido nucleico que comprende un gen asociado a la diferenciación del melanoma (*mda-7*) para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir el crecimiento de un tumor en un sujeto, en el que el tumor comprende células seleccionadas del grupo que consiste en células de cáncer de mama, células de cáncer de cuello del útero, células de cáncer de colon, células de cáncer de próstata, células de cáncer nasofaríngeo, células de cáncer de pulmón, células de osteosarcoma y células de cáncer de tejido conjuntivo.
- 30 7. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 6, en el que el gen asociado a la diferenciación del melanoma (*mda-7*) está ligado a un elemento regulador de forma que su expresión está bajo el control del elemento regulador.
- 35 8. El uso según la reivindicación 7, en el que el elemento regulador es inducible o constitutivo o en el que el elemento regulador es un elemento regulador específico de tejido.
- 40 9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 4 a 8, en el que el ácido nucleico se introduce en las células por tecnología de ADN desnudo, vector de adenovirus, vector de virus adenoasociado, vector del virus de Epstein-Barr, vector del virus del herpes, vector del VIH atenuado, vectores retrovíricos, vector del virus vaccinia, liposomas, liposomas recubiertos de anticuerpos, medios mecánicos o eléctricos.
- 45 10. El uso de una cualquiera de la reivindicación 1 o 4 a 9, en el que la célula cancerosa se caracteriza por la presencia dentro de ella de un gen supresor de tumores defectuoso o por la presencia dentro de ella de un oncogén de acción dominante.
- 50 11. El uso de la reivindicación 10, en el que el gen supresor del tumor es un gen p53, de retinoblastoma (RB) o p16<sup>ink4a</sup> o en el que el oncogén de acción dominante es el gen Ha-ras, p53 mutante o del virus del papiloma humano.

55

**FIGURA 1**

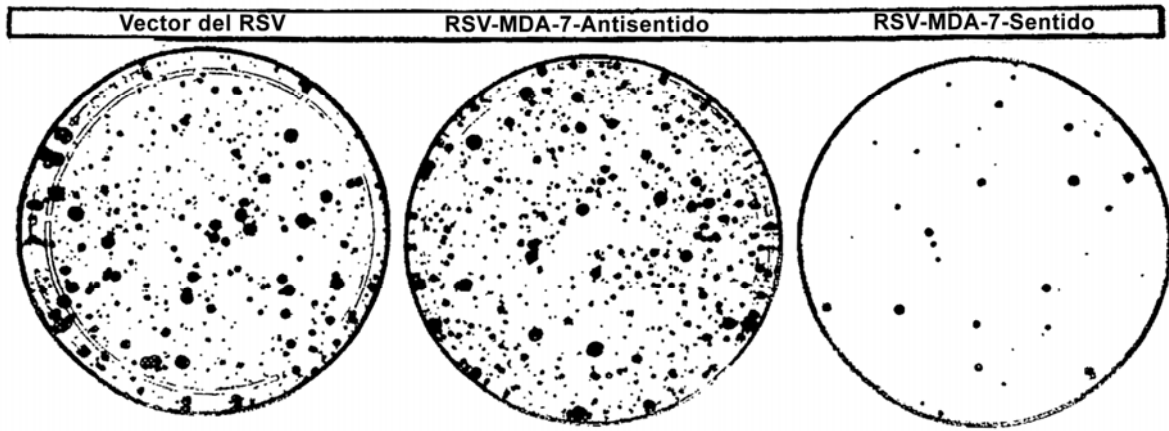
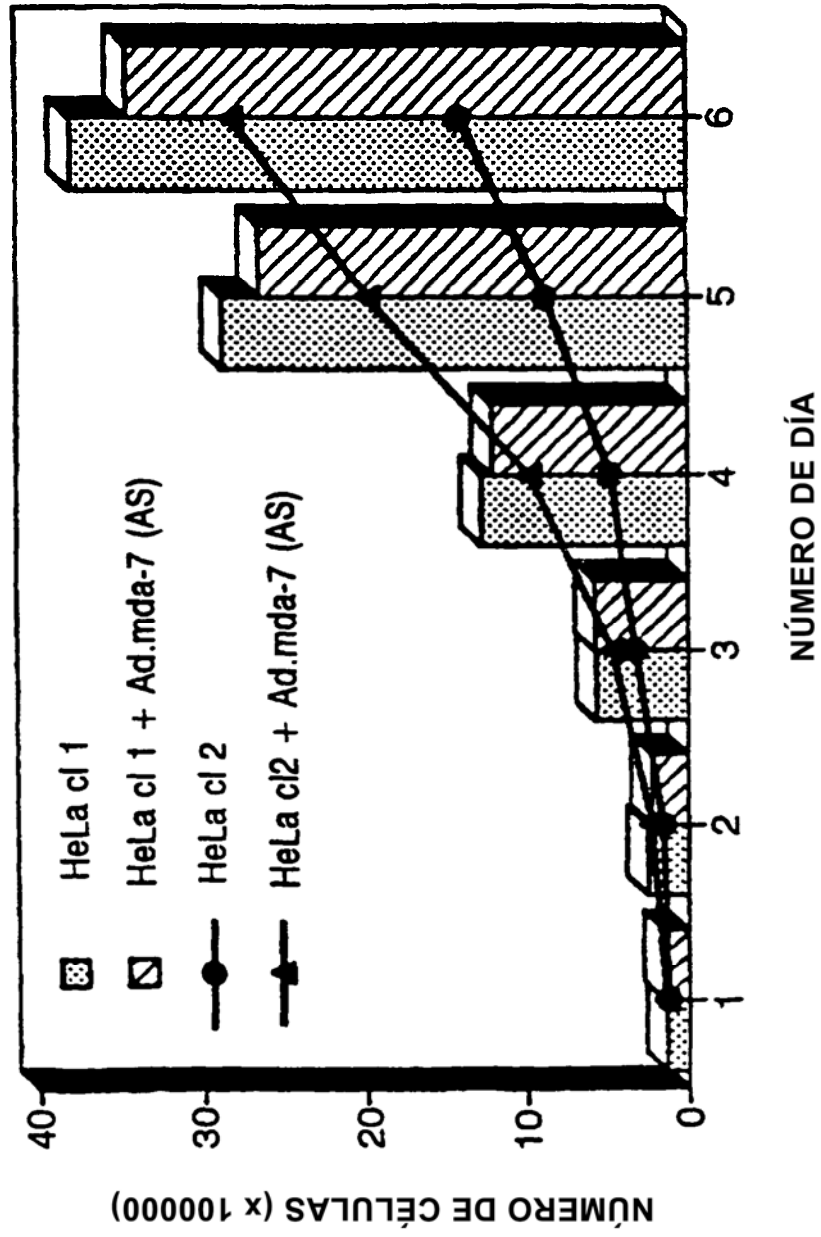
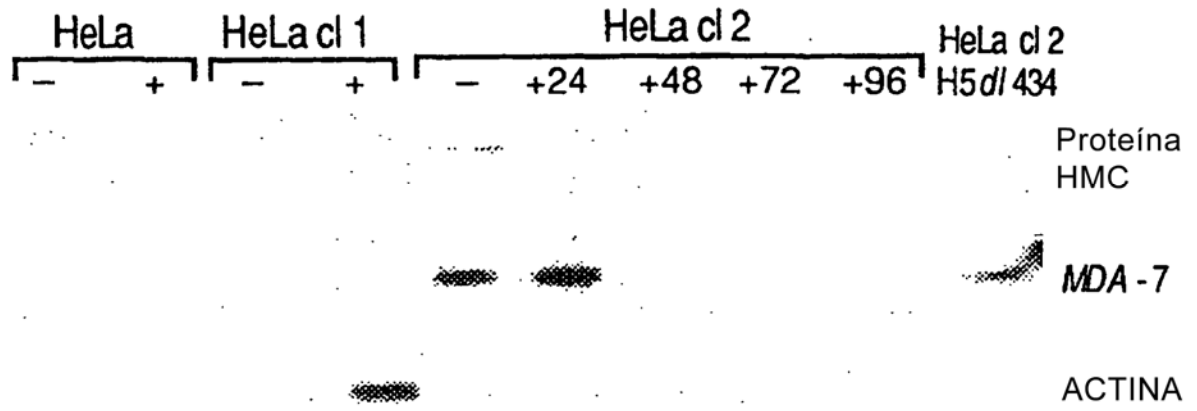
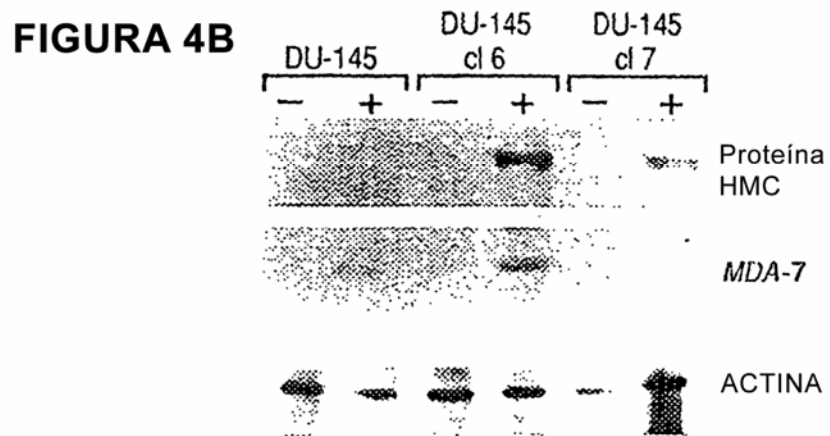
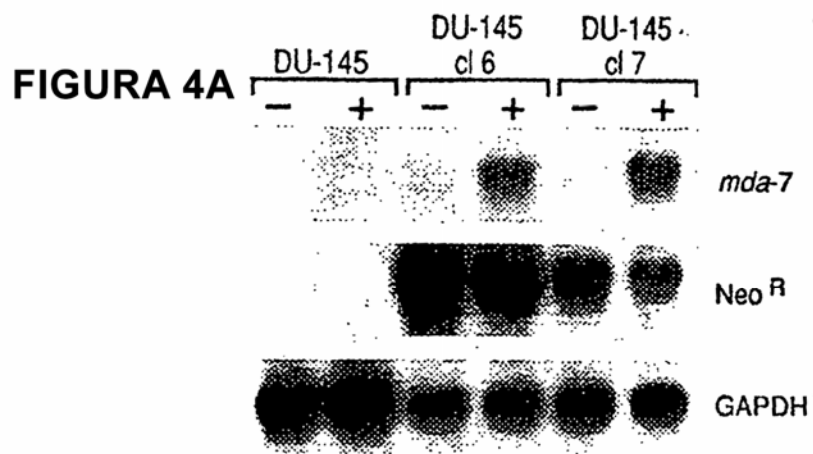


FIGURA 2



**FIGURA 3**

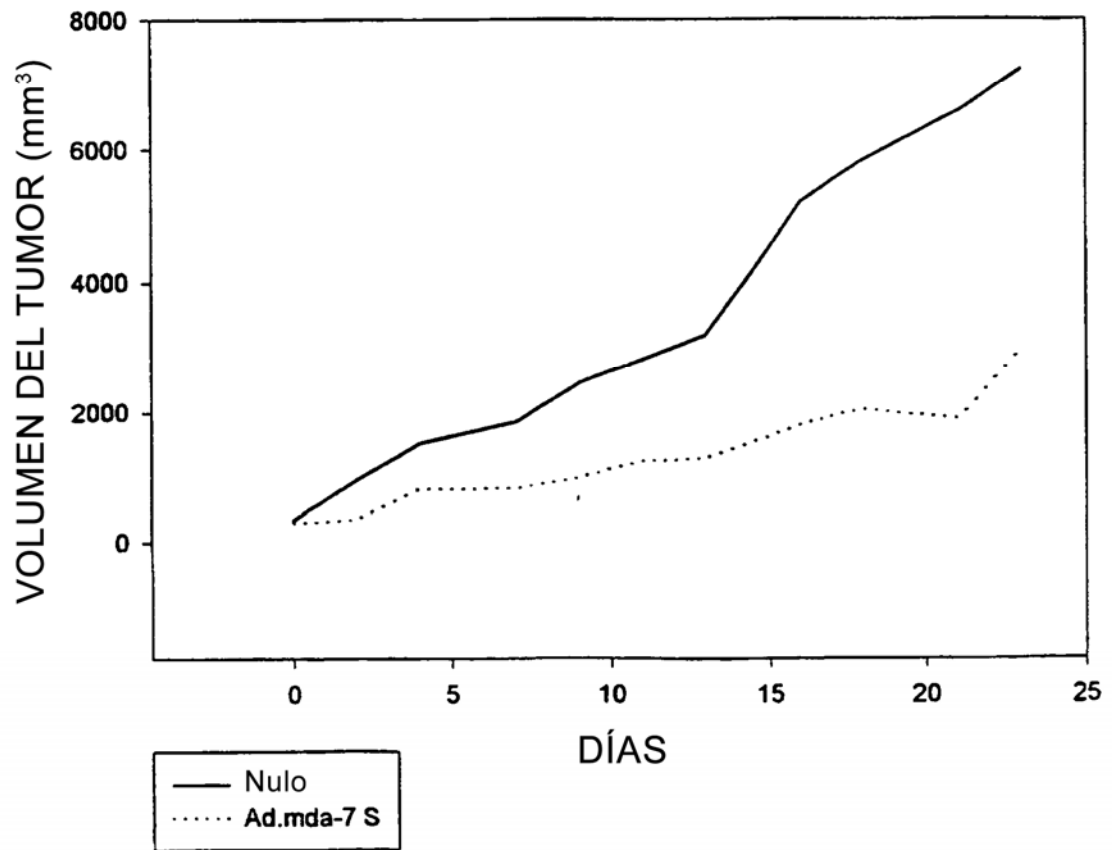






**FIGURA 5**

Crecimiento de células HeLa tratadas con Ad.mda-7 S



**FIGURA 6**

