



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 663**

51 Int. Cl.:  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A01K 67/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05804343 .1**  
96 Fecha de presentación : **12.08.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1786474**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.05.2007**

54 Título: **Terapia génica combinada para el tratamiento de gliomas macroscópicos.**

30 Prioridad: **12.08.2004 US 601100 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.09.2011**

73 Titular/es: **Cedars-Sinai Medical Center  
8700 Beverly Boulevard  
Los Angeles, California 90048, US**

72 Inventor/es: **Lowenstein, Pedro y  
Castro, Maria**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

**ES 2 364 663 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Terapia génica combinada para el tratamiento de gliomas macroscópicos

Campo de la invención

5 La invención se relaciona con el campo del cáncer, y, en modalidades particulares, con composiciones para utilizar en el tratamiento de gliomas macroscópicos.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer cerebral es una enfermedad devastadora y su forma más común, glioblastoma multiforme (GBM), es responsable del 50% de todos los gliomas intracraneales y 25% de los tumores intracraneales en adultos. El diagnóstico de GBM conlleva una supervivencia media entre doce y dieciocho meses (con un 90-95% de supervivencia de los pacientes menor de dos años), sin la posibilidad de remisión espontánea o tratamiento efectivo. La supervivencia consistentemente corta y la ausencia de remisión espontánea que hace de GBM una enfermedad devastadora también hace la evaluación de nuevas terapias para esta enfermedad relativamente rápida y la supervivencia total inequívoca representa el estándar por el cual las terapias de GBM se evalúan. Las opciones de tratamiento disponibles incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia.

15 Los tumores cerebrales son un objetivo atractivo para la terapia génica clínica utilizando vectores virales puesto que, *inter alia*, la enfermedad es rápidamente fatal y no hay terapias efectivas disponibles [Rainov, N.G., A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme, Hum Gene Ther, 11:2389-401 (2000); Lang, F.F. et al., Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results, J Clin Oncol 21:2508-18 (2003); Sandmair, A.M. et al., Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses, Hum Gene Ther, 11: 2197-205 (2000); Klatzmann, D. et al., A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma, Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma, Hum Gene Ther, 9:2595-604 (1998)]. De hecho, la terapia génica es una modalidad terapéutica novedosa atractiva. Los vectores virales pueden transferir los genes a zonas del cerebro relativamente grandes tales como aquellas que comprenden y rodean un tumor cerebral [Chiocca, E.A., et al., Viral therapy for glioblastoma, Cancer J, 9:167-79 (2003); Fulci, G. et al., Oncolytic viruses for the therapy of brain tumors and other solid malignancies: a review, Front Biosci, 8:346-60 (2003); Castro, M.G. et al., Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors, Pharmacol Ther, 98:71-108 (2003)]. A pesar de la eficacia experimental de terapia génica, las pruebas clínicas en humanos han fallado para proporcionar mayores avances terapéuticos [Rainov, N.G., A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme, Hum Gene Ther, 11:2389-401(2000); Lang, F.F. et al., Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results, J Clin Oncol, 21:2508-18 (2003); Sandmair, A.M. et al., Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses, Hum Gene Ther, 11: 2197-205 (2000); Klatzmann, D. et al., A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma, Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma, Hum Gene Ther, 9:2595-604 (1998)]. Uno de los defectos de las pruebas clínicas previas, es que necesariamente se concentran solo en enfoques terapéuticos (*por ejemplo*, la citotoxicidad condicional o inmunoterapia). Además, los modelos de tumores cerebrales microscópicos utilizados experimentalmente pueden no reflejar fielmente tumores humanos de gran tamaño.

Otra divulgación es Cancer Gene Therapy, 9, 2002, 917-924, que revela el uso de Ad-TK y ganciclovir, opcionalmente combinado con Ad-MCSF, para el tratamiento de glioma.

Por lo tanto sigue existiendo una necesidad en el oficio de tratamientos efectivos para el cáncer cerebral que obvien las limitaciones mencionadas anteriormente, y tenga la ventaja de técnicas terapéuticas génicas.

45 Los ejemplos anteriores del oficio relacionado y las limitaciones relacionadas con el mismo tienen la intención de ser ilustrativas y no exclusivas. Otras limitaciones del oficio relacionado serán evidentes para aquellos de habilidad en el oficio después de una lectura de la especificación y un estudio de los dibujos.

Resumen de la invención

50 Las siguientes modalidades y aspectos de estas se describen e ilustran en conjunto con las composiciones que están destinadas a ser ejemplares e ilustrativas, sin limitar el alcance. En varias modalidades, uno o más de los problemas descritos anteriormente han sido reducidos o eliminados, mientras que otras modalidades se dirigen a otras mejoras.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un vector adenoviral que expresa Flt3L y un vector adenoviral que expresa TK para utilizar, como una terapia de combinación, en el tratamiento de glioma en sujetos que también reciben una cantidad terapéuticamente efectiva de ganciclovir administrada sistemáticamente.

Se prefiere que el vector adenoviral que expresa TK exprese HSV-TK.

- 5 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un modelo animal para el tratamiento del glioma, que comprende una rata en donde la rata lleva en al menos una porción de las células de su cerebro por lo menos un ADN de TK exógeno y al menos un ADN de Flt3L exógeno.

10 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, tomada en conjunto con los dibujos acompañantes, que ilustran, a modo de ejemplo, varias características de las modalidades de la invención.

Breve descripción de las figuras

Modalidades ejemplares se ilustran en las figuras de referencia de los dibujos. Se pretende que las modalidades y figuras reveladas en este documento se deben considerar ilustrativas y no restrictivas.

15 Figura 1 ilustra tamaños de tumor (a1-3) a los 3, 6 y 10 días después de la implantación de células CNS1, de acuerdo con una modalidad de la presente invención. Los cerebros se tiñeron con anticuerpo ED1, que perfila la zona de tumor. Con el tiempo los tumores aumentaron de tamaño, y permanecieron localizados en el hemisferio de inyección como se indica por las flechas. (b1-3) La eficiencia de  $8 \times 10^7$  pfu de cualquiera RAdTK+ganciclovir (GCV) o RAdFlt3L para inhibir el crecimiento de tumores de diferentes tamaños.

20 Figura 2 ilustra la supervivencia de animales con tumores macroscópicos tratados en el día 10 con RAdTK + GCV ( $1 \times 10^7$  pfu) y RAdFlt3L/RAdCD40L/RAdIL-12 ( $1 \times 10^7$  pfu) y todos los grupos control necesarios como se indica, de acuerdo con una modalidad de la presente invención. Cada uno de los virus terapéuticos combinados con RAdO ( $1 \times 10^7$  pfu), fueron utilizados como otros controles. Después de la inyección intra-tumoral de virus, los animales fueron inyectados dos veces diariamente con 25mg/kg de GCV, durante siete días.

25 Figura 3 ilustra la supervivencia de animales inmunosuprimidos con tumores macroscópicos tratados en el día 10 con RAdTK+GCV ( $1 \times 10^7$  pfu) y RAdFlt3L ( $1 \times 10^7$  pfu) y todos los grupos control necesarios como se indica, de acuerdo con una modalidad de la presente invención. Después de la inyección intra-tumoral del virus, los animales fueron inyectados dos veces diariamente con 25mg/kg de GCV durante siete días. La inmunosupresión se inició el día siete y continuó durante todo el experimento. Los animales recibieron 10mg/kg de ciclosporina A, administrada por vía oral con sonda gástrica dos veces cada día.

30 Descripción detallada

A menos que se defina de otra manera, los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por alguien de habilidad en el oficio al cual esta invención pertenece. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed, J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1992); y Sambrook and Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001), proporcionan un experto en el oficio con una guía general para muchos de los términos utilizados en la presente aplicación. Un experto en el oficio reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en este documento, que podrían ser utilizados en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita de ninguna manera a los métodos y materiales descritos. Para propósitos de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

45 "Resultados benéficos" incluyen, pero de ninguna manera se limitan a, reducir o aliviar la severidad del cáncer (*por ejemplo*; gliomas) o sus complicaciones, para prevenir o inhibir que se manifieste, para prevenir o inhibir su aparición, simplemente para prevenir o inhibir el empeoramiento, para curar el cáncer, revertir el progreso del cáncer, prolongar la vida del paciente o la esperanza de vida, mejoramiento del cáncer, o un esfuerzo terapéutico para llevar a cabo cualquiera de los mencionados anteriormente, incluso si tal esfuerzo terapéutico en última instancia no tiene éxito.

La "cura" del cáncer cerebral incluye la alteración de la fisiología del sistema nervioso central ("CNS") y/o sus componentes biológicos hasta el punto de que la enfermedad no puede ser detectada después del tratamiento.

50 La "transferencia del gen" o "entrega del gen" se refiere a los métodos o sistemas de forma fiable la inserción de ADN foráneo en las células huésped. Tales métodos pueden dar lugar a la expresión transitoria de ADN transferido no-integrado, replicación extracromosomal y expresión de replicones transferidos (*por ejemplo*, episomas), o

integración de material genético transferido en el ADN genómico de las células huésped. La transferencia del gen proporciona un enfoque único para el tratamiento de enfermedades adquiridas y hereditarias. Un número de sistemas han sido desarrollados para la transferencia génica en células de mamíferos. *Ver, por ejemplo*, U.S. Patent No. 5,399,346. Ejemplos de vehículos bien conocidos para la transferencia génica incluyen adenovirus y adenovirus recombinantes (RAd), virus adeno-asociados (AAV), virus de herpes simple del tipo 1 (HSV-1), y lentivirus (LV).

"Mamífero" como se utiliza en este documento se refiere a cualquier miembro de la clase *Mammalia*, incluyendo, sin limitación, humanos y primates no humanos tales como chimpancés y otros monos y especies de monos; animales de granja tales como ganado, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y conejillos de indias, y similares. El término no indica una determinada edad o sexo. Por lo tanto, sujetos adultos o recién nacidos, así como fetos, ya sea macho o hembra, tienen la intención de ser incluidos dentro del alcance de este término.

"Cantidad terapéuticamente efectiva" como se utiliza en este documento se refiere a la cantidad que es capaz de lograr resultados benéficos en un paciente con cáncer, como el glioma. Una cantidad terapéuticamente efectiva se puede determinar en una forma individual y se basará, al menos en parte, en consideración de las características fisiológicas del mamífero, el tipo de sistema de entrega o técnica terapéutica utilizada y el tiempo de administración en relación con la progresión de la enfermedad.

"Tratamiento" y "que trata", como se utiliza en este documento se refiere a ambos tratamiento terapéutico y profiláctico o medidas preventivas, en donde el objeto es prevenir, reducir y/o disminuir la enfermedad incluso si el tratamiento en última instancia no tiene éxito.

"Vector de AAV" se refiere a cualquier vector derivado de un serotipo de virus adeno-asociado, incluyendo, sin limitación, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAVX7, etc. Los vectores de AAV pueden tener uno o más de los genes del tipo salvaje de AAV suprimido en su totalidad o en parte, preferiblemente los genes Rep y/o Cap, pero retienen secuencias de repeticiones terminales invertidas ("ITR") flanqueantes funcionales. Las secuencias de ITR funcionales, generalmente son necesarias para el rescate, replicación y empaquetado del virión de AAV. Por lo tanto, un vector de AAV se define en este documento para incluir al menos aquellas secuencias necesarias en cis para la replicación y empaquetado (*por ejemplo*, ITRs funcionales) del virus. Las ITRs no necesitan ser las secuencias de nucleótidos del tipo salvaje, y pueden ser alteradas (*por ejemplo*, por la inserción, delección o sustitución de nucleótidos) siempre y cuando las secuencias proporcionadas para el rescate, replicación y empaquetado funcional. Un número de sistemas de entrega del gen basado en adenovirus también han sido desarrollados. Los adenovirus humanos son virus de ADN bicatenario que entran las células por endocitosis mediada por el receptor. Estos virus son particularmente bien apropiados para la transferencia génica puesto que son fáciles de cultivar y manipular y muestran un amplio rango huésped tanto in vivo como in vitro. Los adenovirus se producen fácilmente a títulos altos y es estable de tal manera que pueden ser purificados y almacenados. Incluso en la forma competente de replicación, los adenovirus generalmente causan solo niveles bajos de morbilidad y generalmente no se asocian con tumores humanos. Para las descripciones de varios sistemas de entrega del gen basado en adenovirus, *ver, por ejemplo*, Haj-Ahmad and Graham (1986) *J. Virol.* 57:267-274; Bett et al. (1993) *J. Virol.* 67:5911-5921; Mittereder et al. (1994) *Human Gene Therapy* 5:717-729; Seth et al. (1994) *J. Virol.* 68:933-940; Barr et al. (1994) *Gene Therapy* 1: 51-58; Berkner, K.L. (1988) *BioTechniques* 6:616-629; and Rich et al. (1993) *Human Gene Therapy* 4:461-476. La construcción de vectores de virus adeno-asociados recombinantes ("rAAV") también ha sido descrita. *Ver, por ejemplo*, U.S. Patent Nos. 5,173,414 and 5,139,941; International Patent Publication Numbers WO 92/01070 (published Jan. 23, 1992) y WO 93/03769 (published Mar. 4, 1993); Lebkowski et al. *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996 (1988); Vincent et al., *Vaccines 90* (Cold Spring Harbor Laboratory Press) (1990); Carter, B.J. *Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539 (1992); Muzyczka, N., *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129 (1992); and Kotin, R.M. *Human Gene Therapy* 5:793-801 (1994).

"Virus recombinante" se refiere a un virus que ha sido alterado genéticamente (*por ejemplo*, por la adición o inserción de una construcción de ácido nucleico heterólogo en la partícula).

"Virión de AAV" se refiere a una partícula de virus completa, tal como una partícula del virus AAV del tipo salvaje ("wt") (i.e., incluyendo un genoma de ácido nucleico de AAV monocatenario, lineal asociado con una cubierta de proteína de cápsida de AAV). En este sentido, las moléculas de ácido nucleico de AAV monocatenario de cualquier sentido complementario (i.e., las hebras "sentido" o "antisentido") se puede empaquetar en cualquier virión de AAV; ambas hebras son igualmente infecciosas.

Un "virión de AAV recombinante" o "virión de AAVr" se define en este documento como un virus defectuoso de replicación, infeccioso, compuesto de una cubierta de proteína de AAV, que encapsida una molécula de ADN heteróloga de interés (*por ejemplo*, TK, Flt3L) que se flanquea a ambos sitios por las ITRs de AAV. Un virión de AAVr se puede producir en una célula huésped apropiada que ha tenido un vector de AAV, funciones auxiliares de AAV y funciones accesorio introducidas en esta. De esta manera, la célula huésped, se vuelve capaz de codificar los polipéptidos de AAV que se necesitan para el empaquetado del vector de AAV (i.e., que contiene una secuencia de nucleótidos recombinantes de interés) en partículas de virión recombinante para la posterior entrega del gen.

El término "transfección" se utiliza en este documento para referirse a la absorción del ADN extraño por una célula. Una célula ha sido "transfectada" cuando el ADN exógeno ha sido introducido dentro de la membrana celular. Un número de técnicas de transfección generalmente se conoce en el oficio. *Ver, por ejemplo*, Graham et al. *Virology*, 52:456 (1973); Sambrook et al. *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York (1989); Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* Elsevier (1986), and Chu et al. *Gene* 13:197 (1981). Tales técnicas pueden ser utilizadas para introducir una o más fracciones de ADN exógeno, tales como un vector de plásmido y otras moléculas de ácido nucleico, en células huésped apropiadas. El término se refiere a ambas la absorción estable y transitoria del material genético.

El término "transducción" se refiere a la entrega de una molécula de ADN a una célula receptora ya sea *in vivo* o *in vitro*, vía un vector viral defectuoso de replicación, tal como vía un virión de AAV recombinante.

El término "heterólogo", que se relaciona con las secuencias del ácido nucleico tales como secuencias del gen y secuencias control, se refiere a las secuencias que normalmente no están unidas entre sí y/o normalmente no se asocian con una célula particular. Por lo tanto, una región "heteróloga" de una construcción de ácido nucleico o un vector es un segmento de ácido nucleico dentro o unido a otra molécula de ácido nucleico que no se encuentra en asociación con la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de una construcción de ácido nucleico podría incluir una secuencia codificante flanqueada por las secuencias no encontrada en asociación con la secuencia codificante en la naturaleza. Otro ejemplo de una secuencia codificante heteróloga es una construcción donde la secuencia codificante en sí misma no se encuentra en la naturaleza (*por ejemplo*, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). De manera similar, una célula transformada con una construcción que normalmente no está presente en la célula sería considerada heteróloga para propósitos de esta invención. La variación alélica o eventos mutacionales que ocurren naturalmente no dan lugar a ADN heterólogo, como se utiliza en este documento.

"ADN" tiene la intención de referirse a una forma polimérica de desoxiribonucleótidos (i.e., adenina, guanina, timina y citosina) en forma monocatenaria o bicatenaria, ya sea relajado o superenrollado. Este término se refiere solo a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no se limita a cualquier forma terciaria particular. Por lo tanto, este término incluye ADN monocatenario y bicatenario encontrado, *inter alia*, en moléculas de ADN lineales (*por ejemplo*, fragmentos de restricción), virus, plásmidos, y cromosomas. Al analizar la estructura de moléculas de ADN particulares, las secuencias pueden ser descritas en este documento de acuerdo con la convención normal de dar solo la secuencia en la dirección 5' a 3' entre la hebra no-transcrita de ADN (i.e., la hebra que tiene la secuencia homóloga al ARNm). El término captura las moléculas que incluyen las cuatro bases adenina, guanina, timina y citosina, así como las moléculas que incluyen bases análogas que se conocen en el oficio.

Un "gen" o "secuencia codificante" o una secuencia que "codifica" una proteína particular es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites del gen se determinan por un codón de iniciación en el terminal 5' (i.e., amino) y un codón de terminación de la traducción en el terminal 3' (i.e., carboxi). Un gen puede incluir, pero no se limita a, ADNc a partir de secuencias de ARNm procariota o eucariota, ADN genómico a partir de ADN procariota o eucariota, e incluso de secuencias de ADN sintéticas. Una secuencia de terminación de la transcripción por lo general será localizada en 3' a la secuencia del gen.

El término "elementos control" se refiere colectivamente a regiones promotor, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores secuencia arriba, orígenes de replicación, sitios de entrada de ribosoma internos ("IRES"), potenciadores, y similares, que colectivamente se proporcionan para la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No todos estos elementos control deben estar siempre presentes, siempre y cuando la secuencia codificante seleccionada sea capaz de ser replicada, transcrita y traducida en una célula huésped apropiada.

El término "región promotora" se utiliza en este documento en su sentido común para referirse a una región nucleótido incluyendo una secuencia reguladora de ADN, en donde la secuencia reguladora se deriva de un gen que es capaz de unir la polimerasa del ARN e iniciar la transcripción de una secuencia codificante secuencia abajo (dirección 3').

"Ligado operativamente" se refiere a una configuración de elementos en donde los componentes así descritos se configuran de tal manera que realice su función usual. Por lo tanto, los elementos control ligados operativamente a una secuencia codificante son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante. Los elementos control no necesitan ser contiguos con la secuencia codificante, siempre y cuando funcionen para dirigir la expresión de estos. Por lo tanto, por ejemplo, interviniendo sin traducir incluso las secuencias transcritas pueden estar presentes entre una secuencia promotor y la secuencia codificante y la secuencia promotor incluso se puede considerar "ligada operativamente" a la secuencia codificante.

A los efectos de describir la posición relativa de las secuencias de nucleótidos en un molécula de ácido nucleico Particular a lo largo de la presente aplicación, como cuando una secuencia del nucleótido particular se describe

como situada "secuencia arriba," "secuencia abajo," "5'," o "3'" en relación con otra secuencia, se debe entender que es la posición de las secuencias en la hebra no-transcrita de una molécula de ADN la que está siendo denominada como es convencional en el oficio.

5 "Homología" como se utiliza en este documento se refiere al porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos o dos fracciones de polipéptidos. La correspondencia entre la secuencia a partir de una fracción con otra se puede determinar por técnicas conocidas en el oficio. Por ejemplo, la homología se puede determinar por una comparación directa de la información de la secuencia entre dos moléculas de polipéptidos, mediante la alineación de la información de la secuencia y utilizando programas de ordenadores fácilmente disponibles. De manera alterna, la homología se puede determinar por la hibridación de polinucleótidos bajo condiciones que forman híbridos estables entre regiones homólogas, seguido por la digestión con nucleasa(s) específica(s) monocatenaria(s), y la determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Dos secuencias de ADN o dos secuencias de polipéptidos son "sustancialmente homólogas" la una a la otra cuando al menos aproximadamente 80%, preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de los nucleótidos o aminoácidos, respectivamente, correspondiente en una longitud definida de las moléculas, según se determina utilizando los métodos anteriores.

15 "Aislado" como se utiliza en este documento para referirse a una secuencia de nucleótido, se refiere al hecho que la molécula indicada está presente en la ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. Por lo tanto, una "molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido particular" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es sustancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido tipo. Sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o fracciones adicionales que no afecten perjudicialmente las características básicas de la composición.

25 La presente invención se basa en una metodología de terapia génica combinada que fue probada en un modelo de tumor cerebral macroscópico riguroso. En este modelo, solo las modalidades terapéuticas, tales como citotoxicidad condicional y estimulación inmune, administradas por su propia cuenta, no funcionan. Notablemente, los inventores encontraron que la administración combinada de Flt-3L y HSV1-TK/ganciclovir, sin embargo, prolonga la supervivencia en la mayoría de los animales portadores de un tumor macroscópico en el tiempo de tratamiento. Esta metodología terapéutica novedosa ha sido probada en un modelo pre-clínico riguroso, como se describe en mayor detalle en los siguientes Ejemplos.

30 La especificación revela las composiciones y métodos para el tratamiento del cáncer, y en particular, cáncer cerebral (más particularmente, glioma), utilizando una terapia combinada de Flt-3L y HSV1-TK/ganciclovir, ya sea a través de metodologías terapéuticas de gen totalmente o una metodología de terapia génica que también involucra la inyección directa del péptido (i.e., inyección directa del péptido de Flt-3L combinada con terapia génica utilizando HSV1-TK/ganciclovir). Más específicamente, la especificación revela los métodos de tratamiento del cáncer cerebral, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de Flt-3L y HSV1-TK/ganciclovir a un mamífero en los regímenes de dosificación individualmente apropiados, respectivamente. El mamífero puede ser un humano. Los componentes terapéuticos se pueden formular en composiciones farmacéuticas apropiadas para utilizar en conexión con las técnicas de administración del péptido directas y/o la terapia genética.

40 Las terapias pueden ser administradas por cualquier técnica apropiada, como será apreciado fácilmente por aquellos de habilidad en el oficio. Por ejemplo, cualquier metodología de terapia génica apropiada puede ser implementada para administrar el ADN de interés. El vector HSV-1 puede ser utilizado para administrar TK a las células diana (*por ejemplo*, en el cerebro), y el ganciclovir se administra sistemáticamente. Adicionalmente, Flt-3L puede ser administrado a las células diana (*por ejemplo*, en el cerebro) por cualquier número de técnicas como será apreciado fácilmente por aquellos de habilidad en el oficio. A modo de ejemplo, la proteína Flt-3L puede ser administrada vía una metodología de terapia génica; por ejemplo, a través del uso de un vector RAd (*por ejemplo*, RAd-Flt3L).

45 HSV-1, rAd, rAAV, etc. viriones incluyendo ADN heterólogo correspondiente a una secuencia codificante TK y/o Flt3L puede ser generada por cualquier técnica convencional conocida en el oficio. A modo de ejemplo, los viriones recombinantes, incluyendo el ADN de TK o Flt3L de interés, se pueden producir por una metodología estándar que generalmente involucra las etapas de: (1) introducción de un vector viral en una célula huésped; (2) introducción de una construcción auxiliar en la célula huésped, donde la construcción auxiliar incluye regiones codificantes capaces de ser expresadas en la célula huésped para complementar las funciones auxiliares ausentes del vector; (3) introducción de uno o más virus auxiliares y/o vectores de función accesorio en la célula huésped, en donde los virus auxiliares y/o vectores de función accesorio proporcionan funciones accesorio capaces de soportar una producción del virión recombinante eficiente en la célula huésped; y (4) cultivo de la célula huésped para producir viriones virales recombinantes. El vector, la construcción auxiliar y los virus auxiliares o vector(s) de función accesorio pueden ser introducidos en la célula huésped ya sea de manera simultánea o en serie, utilizando técnicas de transfección estándar. Las técnicas se describen con mayor detalle en los siguientes Ejemplos, en este documento.

Los vectores se construyen utilizando técnicas conocidas para proporcionar al menos, como componentes ligados operativamente en la dirección de la transcripción, (a) elementos control incluyendo una región de iniciación de la

transcripción, (b) el ADN de interés y (c) una región de terminación de la transcripción. Por otra parte, cualquier secuencia codificante suficientemente homóloga a la secuencia codificante TK y/o Flt3L con el fin de mostrar propiedades funcionales sustancialmente similares a la secuencia codificante TK y/o Flt3L, respectivamente, pueden ser utilizados en conexión con modalidades alternas de la presente invención. Los elementos control se seleccionan para ser funcionales en la(s) célula(s) dirigida(s). La construcción resultante, que contiene los componentes ligados operativamente, puede ser unida (5' y 3') con las secuencias ITR funcionales. Las secuencias de nucleótidos de, por ejemplo, regiones ITR de AAV se conocen. *Ver, por ejemplo*, Kotin, R.M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Bems, K.I. "Parvoviridae and their Replication" in Fundamental Virology, 2nd Edition, (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.) para la secuencia de AAV-2. Las ITRs de AAV utilizadas en los vectores de la invención no necesitan tener una secuencia de nucleótido del tipo salvaje, y pueden ser alteradas (*por ejemplo*, por la inserción, delección o sustitución de nucleótidos). Adicionalmente, las ITRs de AAV se pueden derivar de cualquiera de los diversos serotipos de AAV, incluyendo, sin limitación, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAVX7, y similares. Además, ITRs 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótido seleccionada en un vector de expresión de AAV no necesitan necesariamente ser idénticas o derivadas del mismo serotipo de AAV o aislado, siempre y cuando funcionen como se pretende (i.e., para permitir la escisión y replicación de la(s) secuencia(s) de nucleótidos unidas de interés).

Los viriones incluyendo una secuencia codificante TK y/o Flt3L se administran a un mamífero en una cantidad suficiente y por una ruta de administración suficiente de manera que realice la transferencia del gen. Esto puede proporcionar un tratamiento efectivo para el cáncer, y específicamente cáncer cerebral, en el mamífero; particularmente cuando se implanta en conexión con la administración sistémica del ganciclovir.

La especificación revela composiciones farmacéuticas (en conexión con terapias genéticas incluyendo un excipiente farmacéuticamente aceptable junto con ya sea una cantidad terapéuticamente efectiva de un vector viral para la administración de TK y/o Flt3L. El "excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura, no-tóxica, y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéuticamente humano. Tales excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos, o, en el caso de una composición en aerosol, gaseosa.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden formular para administración vía cualquier ruta de administración. La "ruta de administración" puede referirse a cualquier ruta de administración conocida en el oficio, incluyendo pero no limitando a aerosol, nasal, oral, transmucosa, transdérmica o parenteral. "Parenteral" se refiere a una ruta de administración que es generalmente asociado con la inyección, incluyendo intraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesterna, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosa, o transtraqueal. Vía la ruta parenteral, las composiciones pueden ser en la forma de soluciones o suspensiones para infusión o para inyección, o como polvos liofilizados. En una modalidad de la presente invención las composiciones inventivas se inyectan directamente en el cerebro de un mamífero.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención también pueden contener cualquier portador farmacéuticamente aceptable. "Portador farmacéuticamente aceptable" como se utiliza en este documento se refiere a un material, composición, o vehículo farmacéuticamente aceptable que se involucre en llevar o transportar un compuesto de interés a partir de un tejido, órgano, o porción del cuerpo a otro tejido, órgano, o porción del cuerpo. Por ejemplo, el portador puede ser un líquido o relleno sólido, diluyente, excipiente, solvente, o material de encapsulación, o una combinación de estos. Cada componente del portador debe ser "farmacéuticamente aceptable" ya que debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. También debe ser apropiado para utilizar en contacto con cualquiera de los tejidos u órganos con los cuales puede entrar en contacto, lo que significa que no debe llevar un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenecidad, o cualquier otra complicación que supera en exceso sus beneficios terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención también se pueden encapsular, comprimir o preparar en una emulsión o jarabe para la administración oral. Los portadores sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables se pueden adicionar para potenciar o estabilizar la composición, o facilitar la preparación de la composición. Los portadores líquidos incluyen jarabe, aceite de maní, aceite de oliva, glicerina, solución salina, alcoholes y agua. Los portadores sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato de calcio, deshidratar, terra alba, estearato de magnesio o ácido esteárico, talco, pectina, acacia, agar y gelatina. El portador también puede incluir un material de liberación sostenida tales como gliceril monoestearato o gliceril diestearato, solo o con una cera.

Las preparaciones farmacéuticas se hacen siguiendo las técnicas convencionales de la farmacia, que implican molienda, mezcla, granulación, y compresión, cuando sea necesario, para formas de comprimidos; o molienda, mezcla y el llenado de la forma de cápsula de gelatina dura. Cuando un portador líquido se utiliza, la preparación será en la forma de un jarabe, elixir, emulsión o una suspensión acuosa o no-acuosa. Dicha formulación líquida puede ser administrada directamente p.o. o llenada en una cápsula de gelatina blanda.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención, pueden ser administradas en una cantidad terapéuticamente efectiva. La cantidad precisa terapéuticamente efectiva es aquella cantidad de la composición que producirá los resultados más efectivos en términos de eficacia de tratamiento en un sujeto dado. Esta cantidad variará dependiendo de una variedad de factores, incluyendo pero no limitando a las características del compuesto terapéutico (incluyendo actividad, farmacocinética, farmacodinámica, y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (incluyendo edad, sexo, tipo y etapa de la enfermedad, condición física general, respuesta a una dosificación proporcionada, y tipo de medicación), la naturaleza del portador o portadores farmacéuticamente aceptables en la formulación, y la ruta de administración. Un experto en el campo clínico y farmacológico será capaz de determinar una cantidad terapéuticamente efectiva a través de experimentación rutinaria, por ejemplo, por el control de una respuesta del sujeto a la administración de un compuesto y el ajuste de la dosificación por consiguiente. Para obtener una orientación adicional, ver Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed. 20th edition, Williams & Wilkins PA, USA) (2000).

La presente invención incluye diversos modelos *in vivo* del tratamiento de glioma, utilizando una rata que lleva en al menos una porción de las células de su cerebro por lo menos un TK exógeno y un ADN de Flt3L exógeno. Dichos modelos de animales pueden ser útiles para una variedad de propósitos, incluyendo el estudio de un número de enfermedades y condiciones fisiológicas (*por ejemplo*, aquellas descritas en este documento), así como selección de los candidatos terapéuticos para el tratamiento de dichas enfermedades y condiciones fisiológicas, e incluso otros usos que serán fácilmente aparentes para aquellos de habilidad en el oficio.

Los inventores generaron vectores adenovirales que expresan, ya sea Flt3L (RAd-Flt3L) o HSV1-TK (RAd128), y probaron estos para bioactividad *in vitro* e *in vivo*. Los experimentos *in vitro* indicaron que el sobrenadante de células infectadas RAd-Flt3L aumentaron la actividad migratoria de células dendríticas derivadas de monocitos (DC). La inyección *in vivo* de RAd-Flt3L en los cerebros de ratones causó una muy significativa expresión inducida de la expresión de MHC-II en todo el hemisferio del cerebro ipsilateral, y aumentó la presencia dentro del cerebro de ratón de las células que expresan los marcadores de DCs derivadas de monocitos, tales como 33D1 y CD 11c, pero no los marcadores de DCs derivados de linfoides, tales como DEC205 (los datos no se muestran). En el cerebro de rata, RAd-Flt3L indujo la expresión de OX-62, un marcador específico a DC y células 6-T. Los vectores adenovirales que expresan CD40L9 y IL-1210 fueron generados y probados como se describe en otro lugar [Sun, Y. et al., *In vivo* gene transfer of CD40 ligand into colon cancer cells induces local production of cytokines and chemokines, tumor eradication and protective antitumor immunity, *Gene Ther*, 7:1467-76 (2000); Lasarte, J.J. et al., Different doses of adenoviral vector expressing IL-12 enhance or depress the immune response to a coadministered antigen: the role of nitric oxide, *J Immunol*, 162:5270-7 (1999)].

Los inventores han caracterizado y establecido previamente un modelo de gran alcance de animal singénico de tumores cerebrales de glioma utilizando la inyección de células CNS1 en los cerebros de ratas Lewis. Han utilizado exitosamente este modelo para demostrar el efecto de gran alcance de HSV1-TK y ganciclovir sistémico en la eliminación de tumores singénicos, y que permite la supervivencia a largo plazo. Además, en este sistema modelo, en paralelo con la eficiencia terapéutica, también detectaron efectos secundarios adversos a corto y largo plazo en los cerebros de los animales que sobreviven a largo plazo [Dewey, RA. et al., *Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials*, *Nat Med*, 5:1256-63 (1999)]. Otras terapias génicas experimentales incluyen la expresión de supresores de tumor, inhibidores de oncogen, inhibidores de la angiogenesis, metodologías inmuno-estimuladoras, y más recientemente el uso de vectores virales competentes de la replicación, tales como aquellos basados en HSV-1 [Sandmair, A.M. et al., *Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses*, *Hum Gene Ther*, 11:2197-205 (2000); Klatzmann, D. et al., *A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma*, *Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma, Hum Gene Ther*, 9:2595-604 (1998); Fulci, G. et al., *Oncolytic viruses for the therapy of brain tumors and other solid malignancies: a review*, *Front Biosci*, 8:346-60 (2003); Rampling, R. et al., *Toxicity evaluation of replication competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma*, *Gene Ther*, 7:859-66 (2000); Markert, LM. et al., *Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial*, *Gene Ther*, 7:867-74 (2000).; Rainov, N.G. et al., *Vector delivery methods and targeting strategies for gene therapy of brain tumors*, *Curr Gene Ther*, 1:367-83 (2001)]. A pesar de todas estas metodologías que son exitosas en los modelos de tumores cerebrales microscópicos, su eficacia debe ser rigurosamente evaluada en un modelo de glioma intracraneal verdaderamente macroscópico, representativo. Un modelo macroscópico es crítico con el fin de evaluar la eficacia de metodologías de terapia génica, en un modelo preclínico relevante, según se describe en este documento.

Un número de estas metodologías que destruyen tumores han sido probados en ensayos clínicos de fase I/II, con solo un ensayo que procesa una fase III/IV [1]. En la ambientación clínica, ninguna de estas metodologías proporcionaron los avances esperados, aunque algunas pruebas indicaron la suficiente eficacia clínica para justificar otras búsquedas [Rainov, N.G.; *A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme*, *Hum Gene Ther*, 11:2389-401 (2000); Sandmair, A.M. et al., *Thymidine kinase gene*



therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses, *Hum Gene Ther*, 11:2197-205 (2000); Klatzmann, D. et al., A plurse III study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma, Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma, *Hum Gene Ther*, 9:2595-604 (1998); Rampling, R. et al., Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma, *Gene Ther* 7:859-66 (2000); Markert, LM. et al., Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial, *Gene Ther*, 7:867-74 (2000)]. La disociación entre el estímulo de la eficacia experimental y el éxito limitado en ensayos clínicos, aunque frustrante, no es inesperado basándose en la experiencia previa en campos tales como terapéuticos de accidente cerebrovascular. Las potenciales explicaciones para esta aparente paradoja central en las limitaciones de modelos de animales experimentales disponibles.

Los modelos utilizados en estudios previos consistieron de líneas celulares del glioma, mantenidas en el cultivo, y se inyectaron en el flanco o cerebro de los animales. Las terapias usualmente se administran dentro de menos de tres días de la implantación del tumor (i.e., cuando la masa del tumor es muy pequeña (Fig 1, a1)). Estas células crecen en lesiones de masas, que eventualmente matan los animales.

De esta manera, se han desarrollado modelos novedosos que superan las limitaciones intrínsecas de modelos experimentales de tumor cerebral para el desarrollo de tratamientos novedosos de gliomas humanos [Fulci, G. et al., Oncolytic viruses for the therapy of brain tumors and other solid malignancies: a review, *Front Biosci*, 8:346-60 (2003); Castro, M.G. et al., Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors, *Pharmacol Ther*, 98:71-108 (2003); Holland, E.C., Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models, *Nat Rev Genet*, 2:120-9 (2001)]. La mejora de los modelos de tumor cerebral de animales es una preocupación para la comunidad científica, como mejores modelos de tumor fisiopatología y tratamientos de tumores son muy necesarios. Como resultado, un número de modelos de ratones transgénicos han sido desarrollados [Holland, E.C., Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models, *Nat Rev Genet*, 2:120-9 (2001)]. Estos son carentes transgénicos o modelos compuestos de animales carentes, en los cuales los tumores cerebrales se pueden detectar. Aunque estos modelos han incentivado mucho interés en el campo, pueden tener un impacto más fuerte para la comprensión de la fisiopatología de tumores cerebrales que para el desarrollo de novedosas terapias experimentales. Esto se debe al hecho que los tumores se desarrollan en diferentes etapas a lo largo de la vida de los animales y también, para los estudios de eficacia de los tumores tienen que ser de tamaño similar en el tiempo de tratamiento experimental. Hasta ahora, no ha sido posible lograr el uso de los modelos de tumor cerebral transgénico.

Por lo tanto, los inventores utilizaron el modelo de tumor CNS-1 en ratas Lewis para las siguientes características y ventajas sobre otros modelos disponibles: (i) las células CNS1 se derivan de ratas Lewis y por lo tanto, son singénicas en esta cepa de rata; (ii) estas células tienen una velocidad de crecimiento reproducible y a lo largo de la vida desde la implantación a la muerte; y (iii) los tumores son susceptibles a terapias génicas experimentales [Dewey, RA. et al., Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials, *Nat Med* 5:1256-63 (1999); Cowsill, C. et al., Central nervous system toxicity of two adenoviral vectors-encoding variants of the herpes simplex virus type I thymidine kinase: reduced cytotoxicity of a truncated HSV1-TK, *Gene Ther*, 7:679-85 (2000)]. Además, las ratas Lewis son susceptibles a la inducción de encefalomiелitis alérgica experimental y porporcionan así un modelo de gran alcance en el cual evaluar los efectos secundarios inflamatorios a largo plazo de terapias novedosas, potenciales efectos secundarios adversos serios de inmunoterapias, deben servir para erradicar los tumores cerebrales.

Previamente, los inventores utilizaron un modelo, en el cual 5,000 células fueron implantadas unilateralmente en el cuerpo estriado y, tres días después, las terapias génicas experimentales en la forma de vectores adenovirales fueron inyectadas en el mismo sitio del cuerpo estriado. En este modelo, la administración de RAd128 (hCMV-HSV1TK) después de siete días de ganciclovir sistémico rescató al 100% de animales de la muerte [Dewey, RA. et al., Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials, *Nat Med*, 5:1256-63 (1999)]. Estos animales sobreviven a muy largo plazo sin ninguna evidencia clínica o anatómica del progreso del glioma. En el mismo modelo, la inyección de RAd-Fit3L rescató aproximadamente el 60% de los animales (Fig. 1, b1). Sin embargo, en la clínica, HSV1-TK/GCV no ha sido tan eficaz, y Fit3L hasta ahora no se ha probado en modelos de glioma.

Los inventores decidieron así hacer su modelo más riguroso. Para ello, optaron por administrar terapias génicas en tumores mucho más grandes, por la inyección de los virus terapéuticos cuando los tumores fueron verdaderamente macroscópicos y ocupando más del hemisferio del cerebro. Un tumor de este tamaño se detectó a los diez días después de la implantación de 5,000 células CNS1. El tamaño del tumor se determinó durante varios días. Tres días después de la inyección de 5,000 células CNS1, tumores de un promedio de 0.25 mm<sup>3</sup>, 2 mm<sup>3</sup> después de seis días, y 35 mm<sup>3</sup> después de diez días (Fig. 1a1-3). La muerte de los animales control o sin tratar ocurrió aproximadamente a los 20-25 días después de la implantación del tumor de células. El tratamiento con adenovirus que expresa HSV1-TK a los tres días después de la implantación del tumor, y la administración sistémica de GCV durante siete días, rescató todos los animales de la muerte como se demuestra previamente (Fig. b1), mientras que la inyección de un

vector que expresa Flt3L protegió aproximadamente el 60% de los animales de la muerte se evaluó hasta seis meses después de la implantación del tumor si la terapia génica fue administrada a los seis días, la inyección de RAdFlt3L se hace ineficaz, mientras que RAdTK/GCV perdió aproximadamente el 20% de su eficacia, protegió solo el 80% de los animales, mientras que a los diez días esta perdió el 80% de su eficacia, solo una protección del 20% de los animales. Por lo tanto, este modelo ahora reproduce más estrechamente el paradigma humano: los tumores son macroscópicos en el tiempo de tratamiento, y las terapias génicas únicas son solo marginalmente eficaces.

DCs están ausentes del cerebro naïve, pero se detectan dentro del cerebro bajo condiciones que causan inflamación del cerebro [Lowenstein, P.R., Immunology of viral-vector-mediated gene transfer into the brain: an evolutionary and developmental perspective, Trends Immunol, 23:23-30 (2002); McMenamin, P.G., Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholmount preparations, J Camp Neurol, 405:553-62 (1999); Fischer, H.G. et al., Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation, J Immunol, 166:2717-26 (2001); Fischer, H.G. et al., Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with Toxoplasma gondii, J Immunol, 164:4826-34 (2000); Santambrogio, L. et al., Developmental plasticity of CNS microglia, Proc Natl Acad Sci U S A, 98:6295-300 (2001); Serafini, B. et al., Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis, Am J Pathol, 157:1991-2002 (2000)]. La falta de DCs del cerebro podría ayudar a explicar, en parte, la falla para estimular una respuesta inmune anti-tumor en el cerebro. En el modelo macroscópico los inventores decidieron co-administrar ambas RAd-TK/GCV así como un número de agentes inmune-estimuladores que deberían incrementar el número de células dendríticas (*por ejemplo*, Flt3L) [Banchereau, J. et al., Dendritic cells as vectors for therapy, Cell, 106:271-4 (2001)], activar DCs (e.g., CD40L) [Zou, G.M. et al., Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances, Eur Cytokine Netw, 13:186-99 (2002)], o estimular la respuesta inmune de diversos tipos de células inmunes (*por ejemplo*, IL-12) [Puccetti, P. et al., Effects of IL-12 and IL-23 on antigen-presenting cells at the interface between innate and adaptive immunity, Crit Rev Immunol, 22:373-90 (2002); Banchereau, J. et al., Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy, Ann N Y Acad Sci. 987:180-7 (2003)]. La teoría subyacente de estos experimentos fue que la muerte de las células tumorales con HSV1-TK/GCV debería proporcionar epítopos de tumor antigénico para DCs *in situ*. Estas DCs serían tanto reclutadas para el cerebro y/o estimuladas a través de la administración de las terapias génicas específicas. DCs que dejan el cerebro eventualmente estimularían una respuesta inmune adaptativa resultando en la eliminación del tumor y mejora la supervivencia de animales portadores del tumor.

En estudios posteriores, los grupos de animales fueron inyectados diez días después de la implantación del tumor, con Flt3L, IL-12, CD40L, o combinaciones de IL-12 + CD40L, y Flt3L + CD40L. Todos estos tratamientos, no fueron efectivos para prolongar la supervivencia del animal y la eliminación del tumor en comparación con los controles. HSV1-TK/GCV solo protegieron el 20% de los animales; esta protección no se aumentó por la adición de IL 12, y los resultados similares fueron obtenidos después de tratar los animales con Flt3L más IL-12. Ninguno de estos tratamientos fue estadísticamente diferente de los controles. El tratamiento con HSV1-TK/GCV más CD40L rescató el 40% de los animales; este incremento, sin embargo, no alcanzó la significancia estadística en comparación con los animales tratados con HSV1-TK/GCV por su propia cuenta.

El tratamiento combinado con HSV1-TK/GCV y Flt3L sin embargo, rescató un porcentaje altamente significativo de animales de la muerte. Incluso hasta seis meses después de la implantación del tumor, más del 70% de los animales permanecieron vivos, en comparación con animales en todos los grupos control que todos murieron por el día 25 después de la implantación del tumor. Los estudios de los inventores indican que la muerte del tumor cerebral citotóxico condicionalmente con HSV1-TK/GCV de un tumor grande que ocupa más del hemisferio ipsilateral, en combinación con el factor de crecimiento DC Flt3L es capaz de proporcionar una metodología terapéutica eficaz para mejorar el resultado de tumores cerebrales no tratables de otra manera en un modelo animal intracraneal singénico.

La administración de agentes pro-inflamatorios/inmune-estimuladores de gran alcance puede inducir respuestas inmunes anti-CNS sistémicas que pueden causar serios efectos secundarios que podrían comprender la eficacia de la terapia. Para determinar esto, las médulas espinales de los animales en diferentes grupos y que han sobrevivido hasta 6 meses (ilustrado en la Fig. 2) fueron analizadas para determinar la presencia y distribución de infiltrados inflamatorios (células-T y macrófagos) en las meninges, y dentro de las médulas espinales. Los infiltrados inflamatorios de las células T a lo largo de todos los grupos fue muy bajo (10-30 células/sección), pero superior que en los animales control normales (0-2 células T por sección). En un animal (inyectado con TK + IL12) unos infiltrados inflamatorios perivasculares poco típicos se encontraron, en cantidad similar a aquella encontrada en EAE subclínica muy leve. Ningún animal mostró síntomas evidentes de EAE. La distribución de macrófagos a lo largo de la médula espinal, y especialmente a lo largo del tracto cortico-espinal indica una lesión en el tracto piramidal, más probablemente explicado por una lesión a la cápsula interna debido al tumor o incluso una pequeña lesión al tracto piramidal. Incluso una lesión directa o indirecta (compresión) a la cápsula interna, donde el tracto piramidal se localiza en el cerebro anterior, producirá lesiones visibles dentro del tracto corticoespinal en la médula espinal. Como conclusión general, señales evidentes compatibles con EAE completa no fueron detectadas, pero fueron detectados un muy bajo nivel de infiltración de la célula T de las meninges y lesiones de la médula espinal debido a la

degeneración de los axones en la cortico-espinal, más probablemente explicados por el tumor o una pequeña lesión en el tracto piramidal en el cerebro anterior.

Los inventores postularon que si la terapia génica combinada de Flt3L + HSV1TK/GCV es actuar a través de un mecanismo inmuno-estimulador, de inmuno-supresión de estos animales, debería inhibir los efectos terapéuticos del tratamiento combinado. El experimento, por lo tanto se repitió, y los grupos de animales fueron tratados con Ciclosporina-A dos veces diariamente [Guillot, C. et al., Lethal hepatitis after gene transfer of IL-4 in the liver is independent of immune responses and dependent on apoptosis of hepatocytes: a rodent model of IL-4-induced hepatitis, *J Immunol* 166:5225-35 (2001)]. Niveles de Ciclosporina-A en suero fueron medidos y fueron superiores a las dosis clínicas de acuerdo con práctica médica clínica estándar y de laboratorio. Un tratamiento con Ciclosporina-A no tuvo un efecto significativo a lo largo de la vida de ninguno de los animales control, pero suprimió completamente la supervivencia proporcionada por HSV1-TK/GCV combinado con Flt3L. A los 40 días después de la implantación del tumor, y 30 días después de la terapia génica, en animales inmuno-suprimidos con Ciclosporina-A la supervivencia de los animales tratados con ambos HSV1-TK y Flt3L fue reducido al nivel de supervivencia de los animales tratados con HSV1-TK/GCV solo. Por lo tanto, se cree que los efectos terapéuticos benéficos de HSV1-TK/GCV + Flt3L en el modelo de glioma macroscópico es sensible a la inmuno-supresión por la Ciclosporina-A.

El impulso para estos estudios fue descubrir nuevas metodologías para la terapia génica clínica y experimental para tumores cerebrales. Aunque el modelo de tumor de CNS1 "pequeño" de los inventores ha sido valioso [Dewey, RA. Et al., Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials, *Nat Med*, 5:1256-63 (1999)], la falta de estrategias terapéuticas individuales para aumentar la supervivencia de pacientes de glioblastoma humano sugiere que novedosas estrategias terapéuticas y un modelo preclínico más riguroso fue necesario. Por lo tanto, un nuevo modelo de tumores cerebrales fue necesario; un modelo en el cual las estrategias experimentales convencionales fracasarían. La inyección de gliomas del cerebro experimentales grandes que ocupan más de un hemisferio de la rata, suministra terapias efectivas en la eliminación de tumores pequeños completamente ineficaz.

Una consideración de las limitaciones del cerebro para estimular las respuestas inmunes adaptativas contra gliomas del cerebro llevó a la idea de combinar HSV1-TK/GCV con un potente agente de reclutamiento y diferenciación para DCs. La metodología combinada proporcionó una prolongación estadísticamente significativa de supervivencia del animal por más de seis meses en un modelo de tumor, que de otro modo habrían matado las ratas portadoras de tumores entre los días 20-25. Los inventores en este documento mostraron que el mecanismo de acción del tratamiento combinado es inmuno-mediado, como la presencia de inmuno-supresión mediada por la Ciclosporina-A mejoró la supervivencia e invalidó dramática y completamente los efectos benéficos de las terapias génicas combinadas.

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no son para ser interpretados como limitantes del alcance de la invención. En la medida que los materiales específicos se mencionan, es solo para fines ilustrativos y no tiene la intención de limitar la invención. Un experto en el oficio puede desarrollar medios equivalentes o reactivos sin el ejercicio de la capacidad inventiva y sin apartarse de la invención

### Ejemplo 1

#### Vectores de Adenovirus: Producción y Prueba de Actividades Biológicas

RAAd Flt3-L (que expresa ligando de tirosina quinasa similar a Fms), RAAd 35 (que expresa  $\beta$ -galactosidasa), RAAdTK (que expresa HSV-TK), RAAd-CD40L, y RAAd-IL12 fueron producidos y probados de acuerdo con varias modalidades de la presente invención.

RAAds fueron la primera generación de los vectores del tipo 5 recombinantes de adenovirus defectuosos de la replicación que expresan los transgenes bajo el control transcripcional del intermedio del citomegalovirus humano del promotor temprano dentro de la región E1. RAAd 35, un adenovirus que codifica LacZ bajo el control del promotor hCMV originalmente fue descrito por Wilkinson & Akrigg [Wilkinson, G.W. et al., Constitutive and enhanced expression from the CMV major IE promoter in a defective adenovirus vector, *Nucleic Acids Res*, 20:2233-9 (1992)] y ha sido utilizado previamente por los inventores [Dewey, RA. et al., Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials, *Nat Med*. 5:1256-63 (1999); Thomas, C.F. et al., Gene transfer into rat brain using adenovector virals, *Current Protocols in Neuroscience*, Vol. 4.23.1-4.23.40 (ed. Gerfen, J.N., McKay, R., Rogawski, M.A., Sibley, D.R. and Skolnick, P.) 4.23.1-4.23.40 (John Wiley and Sons, New York, New York, NY, 2000); Morelli, A.F., et al., Neuronal and glial cell type-specific promoters within of adenovirus recombinants restrict the expression of the apoptosis-inducing molecule Fas ligand to predetermined brain cell types, and abolish peripheral liver toxicity, *J Gen Virol*, 80:571-83 (Pt 3) (1999); Thomas, C.F. et al., Acute direct adenovector viral

cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain, *Mol Ther* 3:36-46 (2001)]. RAdTK se ha descrito previamente [Dewey, RA. et al., Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials, *Nat Med*, 5:1256-63 (1999); Cowsill, C. et al., Central nervous system toxicity of two adenovector virals encoding variants of the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase: reduced cytotoxicity of a truncated HSV1-TK, *Gene Ther.* 7:679-85 (2000); Thomas, W.S. et al., There is a limited critical period for dopamine's effects on D1 receptor expression in the developing rat neostriatum, *Brain Res Dev Brain Res*, 111: 99-106 (1998); Zermansky, A.J. et al., Towards global and long-term neurological gene therapy: unexpected transgene dependent, high-level, and widespread distribution of HSV-1 thymidine kinase throughout the CNS, *Mol Ther.* 4:490-8 (2001)] y RAd0 no lleva transgen y fue utilizado en los estudios para controlar la carga viral total [Southgate *et al.*, 2000]. RAdFlt3L fue generado por la clonación del ADNc de Flt3L (proporcionado por Immunex) en el único sitio de clonación BamHI del vector lanzadera pAL 119. El vector lanzadera luego fue con-transfectado con el plásmido de adenovirus PJM17 del vector suprimido E1 (obtenido de Microbix Biosystems; Toronto, Canadá) en la línea celular HEK293 de riñón embrionario humano. La presencia de los transgenes dentro de los RAds fue probada mediante el análisis de restricción del ADN viral y por análisis de expresión de proteínas utilizando inmunocitoquímica [Southgate *et al.*, 2000]. Los métodos de generación de adenovirus, producción, caracterización, ampliación, y purificación del vector viral, han sido descritos previamente [Cserr, H.F. et al., Afferent and efferent arms of the humoral immune response to CSF administered albumins in a rat model with normal blood-brain barrier permeability, *J Neuroimmunol*, 41:195-202 (1992); Shering, A.F. et al., Cell typespecific expression in brain cell cultures from a short human cytomegalovirus major immediate early promoter depends on whether it is inserted into herpesvirus or adenovirus vectors, *J Gen Virol*, 78:445-59 (1997); Southgate, T. et al., Gene transfer into neural cells in vivo using adenovector virals, *Current Protocols in Neuroscience*, Vol. 4.23.1-4.23.40 (ed. Gerfen, C.R, McKay, R, Rogawski, MA., Sibley, D.R, Skolnick, P.) 4.23.1-4.23.40 (John Wiley and Sons, New York, New York, NY, 2000)]. Las titulaciones se llevaron a cabo por triplicado y en paralelo de todos los virus mediante la dilución de punto final, ensayo de efecto citopático (cpe), con la centrifugación de placas de 96 pozos infectados como se describe en detalle por Nyberg-Hoffman *et al.* [Southgate, T. et al., Gene transfer into neural cells in vivo using adenovector virals, *Current Protocols in Neuroscience*, Vol. 4.23.1-4.23.40 (ed. Gerfen, C.R, McKay, R, Rogawski, MA., Sibley, D.R, Skolnick, P.) 4.23.1-4.23.40 (John Wiley and Sons, New York, New York, NY, 2000); Nyberg-Hoffman, C. et al., Instability of adenovector virals during transport and its implication for clinical studies, *Nat Med* 5:955-7 (1999)]. El título determinado fue  $6.55 \times 10^{11}$  i.u./ml para RAdFlt3-L,  $3.25 \times 10^{11}$  i.u para RAd TK y  $1.64 \times 10^{11}$  i.u para RAd35. Todas las preparaciones virales fueron seleccionadas para la presencia de adenovirus competente para la replicación [Dion, L.D. et al., Supernatant rescue assay vs. polimerasa chain reaction for detection of wild type adenovirus-contaminating recombinant adenovirus stocks, *J Virol Methods*, 56:99-107 (1996)] y para la contaminación de LPS, utilizando el ensayo de Limulus amebocyte gel clot assay (obtenido de Biowhittaker; UK) [Cotten, M. et al., Lipopolysaccharide is a frequent contaminant of plasmid DNA preparations and can be toxic to primary human cells in the presencia de adenovirus, *Gene Ther.* 1:239-46 (1994)]. Las preparaciones de virus utilizados fueron libres de contaminación de RCA y LPS. Todos los métodos de adenovirus relevantes y los procedimientos del control de calidad se describen en detalle en [Southgate, T. et al., Gene transfer into neural cells in vivo using adenovector virals, *Current Protocols in Neuroscience*, Vol. 4.23.1-4.23.40 (ed. Gerfen, C.R, McKay, R, Rogawski, MA., Sibley, D.R, Skolnick, P.) 4.23.1-4.23.40 (John Wiley and Sons, New York, New York, NY, 2000)]. Los virus fueron diluidos en solución salina estéril para inyección.

RAds que expresan CD40L y IL-12 fueron producidos y han sido descritos previamente con detalle en [Sun, Y. et al., In vivo gene transfer of CD40 ligand into colon cancer cells induces local production of cytokines and chemokines, tumor eradication and protective antitumor immunity, *Gene Ther.* 7:1467-76 (2000); Lasarte, J.J. et al., Different doses of adenoviral vector expressing IL-12 enhance or depress the immune response to a coadministered antigen: the role of nitric oxide, *J Immunol*, 162:5270-7 (1999); Godiska, R. et al., Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells, *J Exp Med*, 185: 1595-604 (1997)].

La actividad biológica del Flt3L expresada por RAds se determinó mediante la habilidad de las proteínas secretadas para atraer las DCs mono-derivadas en un ensayo de migración quimiotáctico. Los medios condicionados generados a partir de las células Cos7 infectadas con un incremento de MOI de cualquiera RAdMDC o RadFlt3L fue utilizado, que van desde ausencia del virus, MOI 0 a MOI 1000. El ensayo involucra la adición de solución quimioatrayente y medio control a los pozos inferiores de la cámara quimiotáctica. Estos pozos se cubren con un filtro de policarbonato (tamaño de poro 5 mm) y se cubren con un empaque de silicona y la placa superior. La cámara superior se sembró con 50µl de suspensión celular ( $0.7-1,5 \times 10^6$ /ml). La cámara luego fue incubada a 37°C, 5 CO<sub>2</sub> durante dos horas. Después de la incubación, los filtros se retiraron, se tiñeron, y se contaron las células. Los resultados se expresan como el número medio de células migradas. Los medios condicionados de las células infectadas con RAd-FLt3L fueron 2-6 veces más eficientes en comparación con los controles para efectuar la actividad quimiotáctica de DCs derivadas de monocitos (los resultados no se muestran).

## 60 Ejemplo 2

Modelos Animales: Modelo de tumor macroscópico

Las ratas Lewis machos (225-250g de peso corporal) fueron anestesiados con halotano y se colocaron en un marco estereotáxico que ha sido modificado para utilizar con anestesia por inhalación [Thomas, C.F. et al., Acute direct adenoviral vector cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain, *Mol Ther.* 3:36-46 (2001)]. Los animales fueron inyectados en el cuerpo estriado izquierdo (1 mm por delante del bregma, 3 mm lateral y ventral 4 mm de la dura) con  $5 \times 10^3$  células CNS1 [Dewey, RA. et al., Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials, *Nat Med* 5:1256-63 (1999)]. Las células fueron administradas en un volumen de 3 ml utilizando una jeringa de 10 ml-hamilton. Para cada inyección una pequeña bolsa fue creada antes de la deposición de las células en el cuerpo estriado. Esto involucra el movimiento de la aguja de 0.2 mm por debajo de las coordenadas indicadas, sosteniendo durante 1 minuto antes de mover hasta las coordenadas indicadas, e inyectar lentamente todas las células durante un periodo de 3 minutos. La aguja se deja en su lugar por otros 5 minutos antes de ser retirada. Los virus fueron inyectados en el tumor 3 días después de la implantación de las células CNS1, utilizando las mismas coordenadas anterior y lateral. Las dosis de  $1 \times 10^7$  i.u y  $8 \times 10^7$  i.u de RAdFlt3L fueron inyectadas vía intratumoral. RAd35 y solución salina fueron utilizados como controles. Los animales fueron controlados a diario, y las ratas que mostraron morbilidad fueron perfundidos fijos con Tyrode heparinizado seguido por 4% de paraformaldehído en PBS. Los cerebros se retiraron para análisis histológico. A los animales que sobreviven al tratamiento se les permitió sobrevivir por hasta tres y seis meses con el fin de evaluar la eficacia y el impacto del tratamiento en el cerebro.

### Ejemplo 3

#### 20 Modelo de tumor grande

Las ratas Lewis machos (225-250g de peso corporal) fueron inyectados en el cuerpo estriado izquierdo (1 mm por delante del bregma, 3 mm lateral y ventral 4 mm de dura) con  $5 \times 10^3$  células de CNS1 según se describe arriba. Las dosis de  $8 \times 10^7$  i.u de cualquiera RAdTK (RAd128) o RAdFlt3L fueron inyectados vía intratumoral 3 días, 6 días y 10 días después de la implantación del tumor, con el fin de determinar en qué punto de tiempo, después de la implantación del tumor estos tratamientos fracasarían (i.e., animales morirían dentro de 30 días). Los animales fueron controlados a diario, y los animales que mostraron morbilidad fueron perfundidos-fijos y los cerebros se retiraron para un examen histológico. Al mismo tiempo, para determinar el tamaño de los tumores en el tiempo de tratamiento, los animales fueron perfundidos fijos 3 días, 6 días y 10 días después de la implantación de CNS1. Secciones de cerebro seriales de 40mm de espesor fueron cortadas utilizando un vibrotome. La sección en la cual el tumor ocupa la superficie más grande del cuerpo estriado fue utilizada para el cálculo del tamaño del tumor. Para determinar el tamaño de los tumores en cada punto, la siguiente ecuación, que determina el volumen de un ovoide, fue utilizada:  $4/3\pi r_{abc}$ , donde a es el radio más corto de la cara de la sección transversal del tumor; b es el radio más largo de la cara de la sección transversal del tumor; y c es el espesor total del tumor en mm. Los diez días después de la implantación de las células CNS1, el modelo de tumor macroscópico fue utilizado para evaluar la eficacia y los efectos secundarios de metodologías combinadas de terapia genética mediada inmune y HSV1-TK, según se describe a continuación.

Diez días después de la implantación de las células CNS1, las ratas fueron inyectadas vía intratumoral con  $1 \times 10^7$  i.u RAdTK combinado con ya sea  $1 \times 10^7$  i.u de RAdFlt3L, RAdCd40L, RAdIL-12, o RAd0. En el día once después de la inyección del virus, 25mg/kg de ganciclovir (obtenido de Cymvene; Roche; Welwyn Garden City, UK) fue inyectado vía intraperitoneal dos veces al día durante siete días.

Cada uno de los virus combinados con RAd0 fue utilizado como controles experimentales. Todos los animales incluyendo los controles recibieron ganciclovir. Los animales fueron controlados diariamente por detectar cualquier signo de morbilidad, y fueron perfundidos-fijos y los cerebros y las médulas espinales se retiraron para el análisis histológico. A los supervivientes a largo plazo se les permitió sobrevivir hasta seis meses.

#### 45 Ejemplo 4

##### Tratamiento con Ciclosporina-A

En experimentos que involucran inmunosupresión, los animales fueron inmunosuprimidos siete días después de la implantación de las células CNS1. Los animales recibieron 10mg/kg de Ciclosporina-A (obtenida de Neoral; Sandoz)/300µl de aceite de oliva administrada por vía oral con sonda gástrica dos veces diariamente hasta la terminación del experimento. A un grupo separado de animales se les dio solo 300µl de aceite de oliva y fueron los controles negativos para los experimentos de inmunosupresión.

### Ejemplo 5

#### Inmunohistoquímica del Cerebro

Secciones coronales de 40µm de espesor, se cortaron a través del cuerpo estriado utilizando un vibratome. La libre flotación de inmunohistoquímica se llevó a cabo para detectar marcadores de células inmunes e inflamatorias. La peroxidasa endógena fue inactivada con 0.3% de peróxido de hidrógeno, y las secciones fueron bloqueadas con 10% de suero de caballo (obtenido de Life Technologies; Paisley, Scotland) antes de la incubación durante la noche con anticuerpo primario diluido en PBS que contiene 1% de suero de caballo y 0.5% de Triton X100. Los anticuerpos primarios y las diluciones en las cuales ellos se utilizaron fueron ED1 (macrófagos activados/células microgliales, 1:1,000; obtenido de Serotec), anti-CD8 (linfocitos T citotóxicos y células NK, 1:500; obtenidos de Serotec), Anti-CD8b (cadena β de células T restringidas de MHC1, dilución 1:2000; obtenido de Becton Dickenson), Anti-CD161 (receptor en las células NK, dilución 1:2000; obtenido de Becton Dickenson), anti OX62 (DCs, 1:20; obtenido de Serotec) y proteína básica anti-mielina (1:2,000; obtenido de Dako). Todos los anticuerpos primarios fueron ratón anti-rata monoclonal, excepto para la proteína básica anti-mielina, que fue conejo anti-humano policlonal. Los anticuerpos secundarios fueron biotinados de conejo anti-ratón o biotinados de cerdo anti-conejo (Dako), diluido 1:200 en 0.5% de Triton X100 con 1% de suero de caballo, y fueron detectados utilizando el método peroxidasa de rábano picante Vectastain Elite ABC (obtenido de Vector Laboratories). Después de desarrollar con diaminobenzidina y glucosa oxidasa, las secciones se montaron sobre portaobjetos de vidrio gelatinizados y fueron deshidratados a través de soluciones de etanol graduado antes del cubreobjeto.

### **Ejemplo 6**

#### Microscopio

Los tejidos fueron observados con el microscopio Olympus (AH2-RFL), y las imágenes se capturaron por técnicas fotográficas estándar. Las imágenes de bajo y alto aumento presentadas fueron fotografiadas, ya sea a 1x4, o 10x2.5 respectivamente. El análisis morfológico involucró aumentos mayores, 40x2.5, o 60x2.5 o 10x2.5. Las imágenes de las secciones del cerebro completo fueron tomadas a 1x2.5.

### **Ejemplo 7**

#### Inmunohistoquímica de la Médula Espinal

Los animales fueron perfundidos con 4% de paraformaldehído en solución reguladora de fosfato 0.1 M. La médula espinal fue disecada y 12 a 14 bloques a partir de todos los niveles de la médula fueron embebidos rutinariamente en parafina. Secciones de cinco milímetros de espesor se tiñeron con hematoxilina & eosina, con tinción Luxal fast blue myelin y con impregnación de plata de Bielschowsky para los axones. Las secciones en serie adyacentes fueron sometidas a inmunocitoquímica para células-T (W3/13; obtenida de Seralab; UK) y macrófagos (ED1; obtenido de Serotec). El enlace de anticuerpos primarios fue visualizado con un sistema biotina avidina, utilizando inmunoglobulina anti-ratón específico de especie biotinilada (obtenida de Amersham; UK) y avidina peroxidasa (obtenida de Sigma; St. Louis, MO). La reacción de la peroxidasa fue desarrollada con diaminobenzidina (obtenida de Fluka; Switzerland).

### **Ejemplo 8**

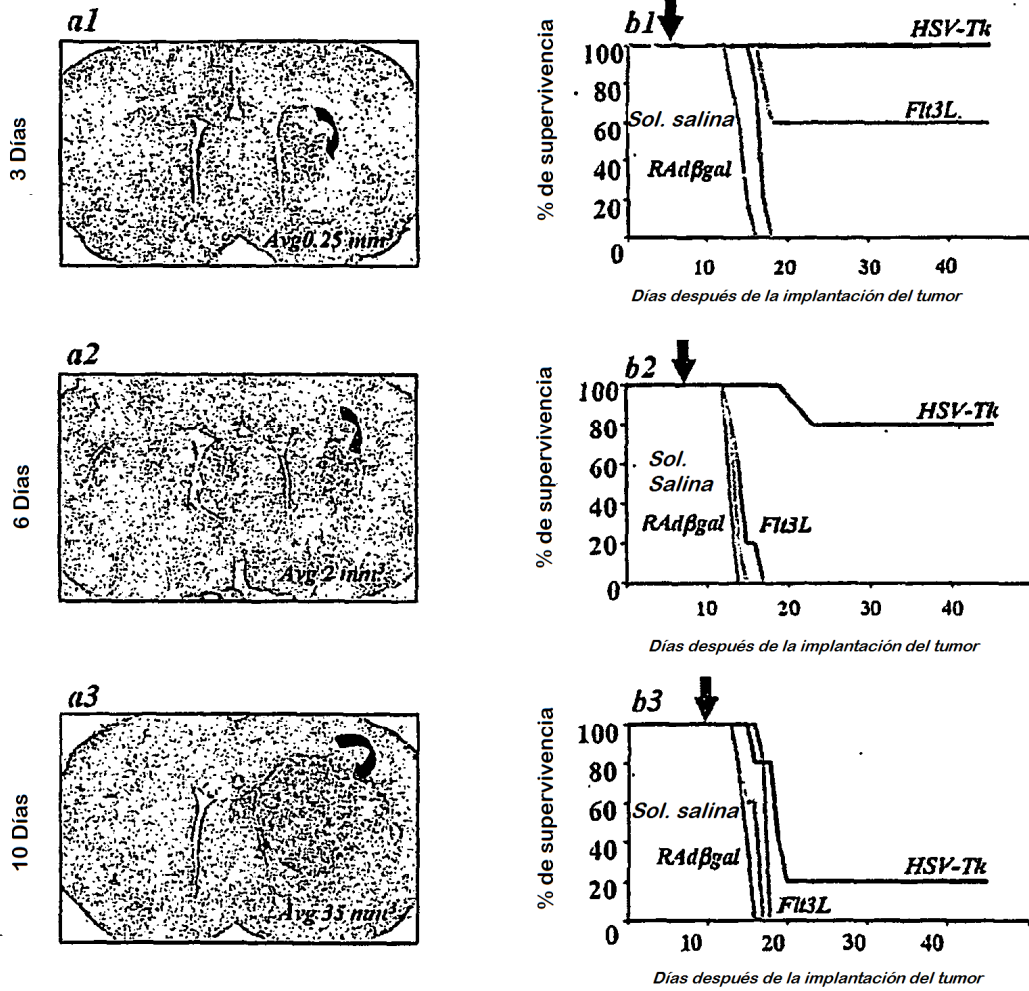
#### Análisis Estadístico

Los datos de supervivencia fueron analizados por el análisis de estimación de Kaplan-Meier, y se compararon utilizando las pruebas de logaritmo del rango fueron realizadas utilizando el software SPSS y el software PRISM.

**REIVINDICACIONES**

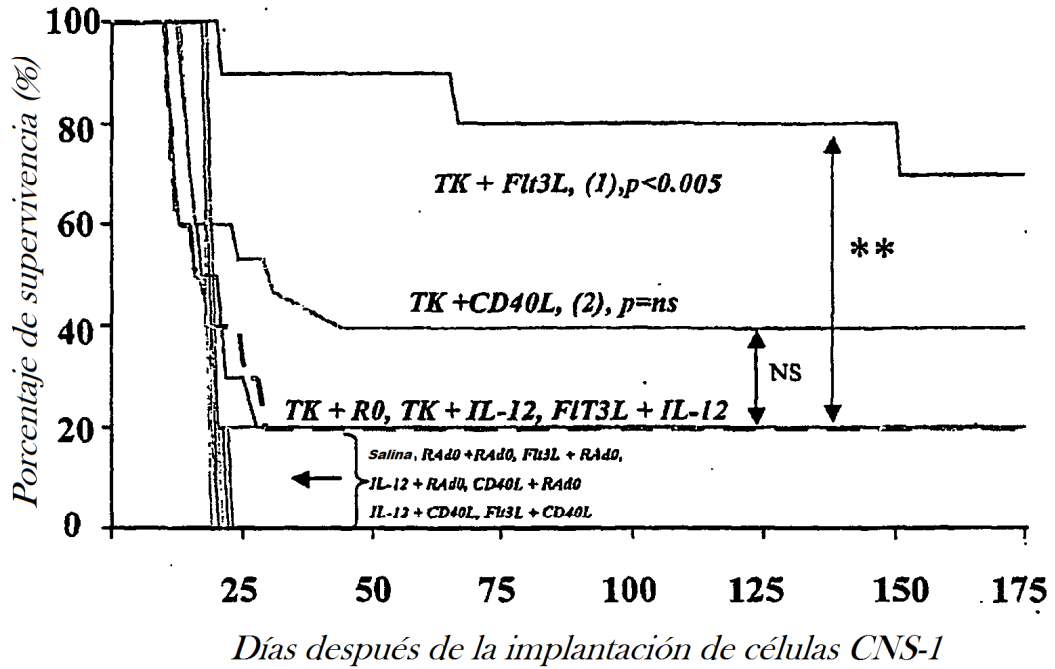
1. Un vector adenoviral que expresa Flt3L y un vector adenoviral que expresa TK para utilizar, como una terapia de combinación, en el tratamiento de glioma en sujetos que también reciben una cantidad terapéuticamente efectiva de ganciclovir administrada sistemáticamente.
- 5 2. Los vectores virales de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vector adenoviral que expresa TK expresa HSVTK.
3. Un modelo animal para el tratamiento de glioma, que comprende una rata en donde la rata lleva en al menos una porción de las células de su cerebro por lo menos un ADN de TK exógeno y por lo menos un ADN de Flt3L exógeno

Figura 1

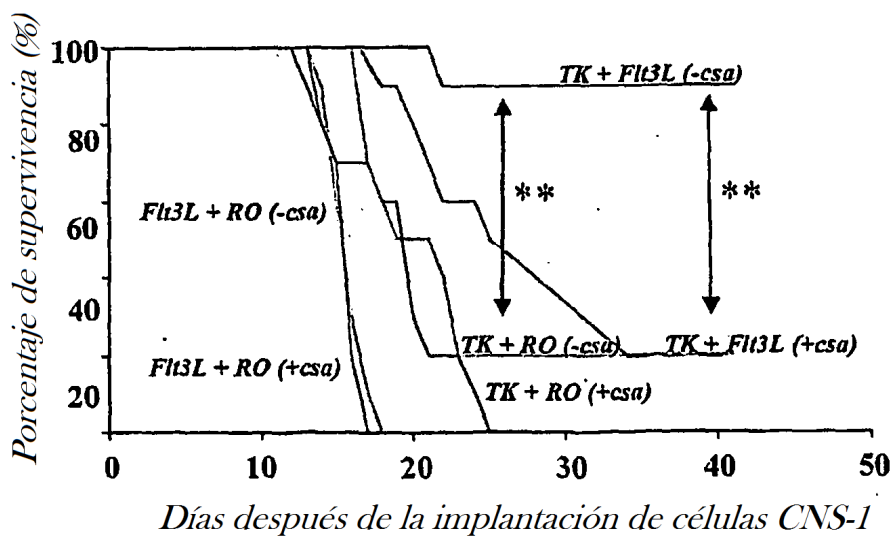




**Figura 2**



**Figura 3**



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION**

*Esta lista de referencias citada por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.*

5 **Documentos de patentes citadas en la descripción**

- US 5399346 A [0016]
- US 5173414 A [0020]
- US 5139941 A [0020]
- WO 9201070 A [0020]

10 • WO 9303769 A [0020]

**Literatura no-patente citada en la descripción**

- **Rainov, N.G.** A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther*, 2000, vol. 11, 2389-401 [0003] [0050]
- 15 • **Lang, F.F. et al.** Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results. *J Clin Oncol*, 2003, vol. 21, 2508-18 [0003]
- **Sandmair, A.M. et al.** Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication- deficient retroviruses or adenoviruses. *Hum Gene Ther*, 2000, vol. 11, 2197-205 [0003] [0049] [0050]
- 20 • **Klatzmann, D. et al.** A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma, Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma. *Hum Gene Ther*, 1998, vol. 9, 2595-604 [0003] [0049]
- **Chiocca, E.A. et al.** Viral therapy for glioblastoma,. *Cancer J*, 2003, vol. 9, 167-79 [0003]
- **Fulci, G. et al.** Oncolytic viruses for the therapy of brain tumors and other solid malignancies: a review. *Front Biosci*, 2003, vol. 8, 346-60 [0003] [0049] [0052]
- 25 • **Castro, M.G. et al.** Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacol Ther*, 2003, vol. 98, 71-108 [0003]
- **Sandmair, A.M. et al.** Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication- deficient retroviruses or adenoviruses,. *Hum Gene Ther*, 2000, vol. 11, 2197-205 [0003]
- 30 • **Klatzmann, D. et al.** A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma, Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma. *Hum Gene Ther*, 1998, vol. 9, 2595-604 [0003]
- *Cancer Gene Therapy*, 2002, vol. 9, 917-924 [0004]
- **Singleton et al.** Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. J. Wiley & Sons, 1994 [0013]
- **March.** Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure. J. Wiley & Sons, 1992 [0013]
- 35 • **Sambrook ; Russel.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 [0013]
- **Haj-Ahmad ; Graham.** *J. Virol.*, 1986, vol. 57, 267-274 [0020]
- **Bett et al.** *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 5911-5921 [0020]
- **Mittereder et al.** *Human Gene Therapy*, 1994, vol. 5, 717-729 [0020]

- Seth et al. *J. Virol.*, 1994, vol. 68, 933-940 [0020]
- Barr et al. *Gene Therapy*, 1994, vol. 1, 51-58 [0020]
- Berkner, K.L. *BioTechniques*, 1988, vol. 6, 616-629 [0020]
- Rich et al. *Human Gene Therapy*, 1993, vol. 4, 461-476 [0020]
- 5 • Lebkowski et al. *Molec. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 3988-3996 [0020]
- Vincent et al. *Vaccines*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990, vol. 90 [0020]
- Carter, B.J. *Current Opinion in Biotechnology*, 1992, vol. 3, 533-539 [0020]
- Muzyczka, N. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.*, 1992, vol. 158, 97-129 [0020]
- Kotin, R.M. *Human Gene Therapy*, 1994, vol. 5, 793-801 [0020]
- 10 • Graham et al. *Virology*, 1973, vol. 52, 456 [0024]
- Sambrook et al. *Molecular Cloning, a laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Laboratories, 1989 [0024]
- Davis et al. *Basic Methods in Molecular Biology* [0024]
- Chu et al. *Gene*, 1981, vol. 13, 197 [0024]
- Kotin, R.M. *Human Gene Therapy*. 1994, vol. 5, 793-801 [0039]
- 15 • Parvoviridae and their Replication. Bems, K.I. *Fundamental Virology* [0039]
- Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*. Williams & Wilkins, 2000 [0046]
- Sun, Y. et al. In vivo gene transfer of CD40 ligand into colon cancer cells induces local production of cytokines and chemokines, tumor eradication and protective antitumor immunity. *Gene Ther*, 2000, vol. 7, 1467-76 [0048]
- 20 • Lasarte, J.J. et al. Different doses of adenoviral vector expressing IL-12 enhance or depress the immune response to a coadministered antigen: the role of nitric oxide. *J Immunol*, 1999, vol. 162, 5270-7 [0048] [0066]
- Dewey, R.A. et al. Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials. *Nat Med*, 1999, vol. 5, 1256-63 [0049] [0053] [0054] [0061] [0065] [0068]
- 25 • Rampling, R. et al. Toxicity evaluation of replication- competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene Ther*, 2000, vol. 7, 859-66 [0049] [0050]
- Markert, L.M. et al. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther*, 2000, vol. 7, 867-74 [0049]
- Rainov, N.G. et al. Vector delivery methods and targeting strategies for gene therapy of brain tumors. *Curr Gene Ther*, 2001, vol. 1, 367-83 [0049]
- 30 • Klatzmann, D. et al. A phase III study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma, Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma. *Hum Gene Ther*, 1998, vol. 9, 2595-604 [0050]
- Markert, L.M. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther*, 2000, vol. 7, 867-74 [0050]
- 35 • Castro, M.G. et al. Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors,. *Pharmacol Ther*, 2003, vol. 98, 71-108 [0052]
- Holland, E.C. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet*, 2001, vol. 2, 120-9 [0052]

- **Cowsill, C. et al.** Central nervous system toxicity of two adenoviral vectors-encoding variants of the herpes simplex virus type I thymidine kinase: reduced cytotoxicity of a truncated HSV1-TK. *Gene Ther*, 2000, vol. 7, 679-85 [0053]
- **Lowenstein, P.R.** Immunology of viral-vector-mediated gene transfer into the brain: an evolutionary and developmental perspective. *Trends Immunol*, 2002, vol. 23, 23-30 [0056]
- 5 • **McMenamin, P.G.** Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *J Comp Neurol*, 1999, vol. 405, 553-62 [0056]
- **Fischer, H.G. et al.** Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol*, 2001, vol. 166, 2717-26 [0056]
- 10 • **Fischer, H.G. et al.** Phenotype and functions of brain dendritic cells emerging during chronic infection of mice with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, 2000, vol. 164, 4826-34 [0056]
- **Santambrogio, L. et al.** Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, vol. 98, 6295-300 [0056]
- 15 • **Serafini, B. et al.** Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*, 2000, vol. 157, 1991-2002 [0056]
- **Banchereau, J. et al.** Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell*, 2001, vol. 106, 271-4 [0056]
- **Zou, G.M. et al.** Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur Cytokine Netw*, 2002, vol. 13, 186-99 [0056]
- 20 • **Puccetti, P. et al.** Effects of IL-12 and IL-23 on antigen-presenting cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Crit Rev Immunol*, 2002, vol. 22, 373-90 [0056]
- **Banchereau, J. et al.** Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, vol. 987, 180-7 [0056]
- 25 • **Guillot, C. et al.** Lethal hepatitis after gene transfer of IL-4 in the liver is independent of immune responses and dependent on apoptosis of hepatocytes: a rodent model of IL-4-induced hepatitis. *J Immunol*, 2001, vol. 166, 5225-35 [0060]
- **Wilkinson, G.W. et al.** Constitutive and enhanced expression from the CMV major IE promoter in a defective adenovirus vector. *Nucleic Acids Res*, 1992, vol. 20, 2233-9 [0065]
- 30 • **Dewey, RA. et al.** Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials. *Nat Med.*, 1999, vol. 5, 1256-63 [0065]
- **Thomas, C.F. et al.** Gene transfer into rat brain using adenoviral vectors. *Current Protocols in Neuroscience*, 2000, vol. 4.23.1-4 [0065]
- 35 • **Morelli, A.F. et al.** Neuronal and glial cell type-specific promoters within adenovirus recombinants restrict the expression of the apoptosis-inducing molecule Fas ligand to predetermined brain cell types, and abolish peripheral liver toxicity. *J Gen Virol*, 1999, vol. 80, 571-83 [0065]
- **Thomas, C.F. et al.** Acute direct adenoviral vector cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain. *Mol Ther*, 2001, vol. 3, 36-46 [0065]
- 40 • **Cowsill, C. et al.** Central nervous system toxicity of two adenoviral vectors encoding variants of the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase: reduced cytotoxicity of a truncated HSV1-TK. *Gene Ther.*, 2000, vol. 7, 679-85 [0065]
- **Thomas, W.S. et al.** There is a limited critical period for dopamine's effects on D1 receptor expression in the developing rat neostriatum. *Brain Res Dev Brain Res*, 1998, vol. 111, 99-106 [0065]
- **Zermansky, A.J. et al.** Towards global and long-term neurological gene therapy: unexpected transgene dependent, high-level, and widespread distribution of HSV-1 thymidine kinase throughout the CNS. *Mol Ther.*, 2001, vol. 4, 490-8 [0065]

- **Cserr, H.F. et al.** Afferent and efferent arms of the humoral immune response to CSF administered albumins in a rat model with normal blood-brain barrier permeability. *J Neuroimmunol*, 1992, vol. 41, 195-202 **[0065]**
- 5 • **Shering, A.F. et al.** Cell type-specific expression in brain cell cultures from a short human cytomegalovirus major immediate early promoter depends on whether it is inserted into herpesvirus or adenovirus vectors. *J Gen Virol*, 1997, vol. 78, 445-59 **[0065]**
- Gene transfer into neural cells in vivo using adenoviral vectors. **Southgate, T. et al.** *Current Protocols in Neuroscience*. John Wiley and Sons, 2000, vol. 4.23.1-4, 4.23.1-4.23.40 **[0065]**
- Gene transfer into neural cells in vivo using adenoviral vectors, **Southgate, T. et al.** *Current Protocols in Neuroscience*. John Wiley and Sons, 2000, vol. 4.23.1-4 **[0065]**
- 10 • **Nyberg-Hoffman, C. et al.** Instability of adenoviral vectors during transport and its implication for clinical studies. *Nat Med*, 1999, vol. 5, 955-7 **[0065]**
- **Dion, L.D. et al.** Supernatant rescue assay vs. polymerase chain reaction for detection of wild type adenovirus-contaminating recombinant adenovirus stocks,. *J Virol Methods*, 1996, vol. 56, 99-107 **[0065]**
- 15 • **Cotten, M. et al.** Lipopolysaccharide is a frequent contaminant of plasmid DNA preparations and can be toxic to primary human cells in the presence of adenovirus. *Gene Ther*, 1994, vol. 1, 239-46 **[0065]**
- **Sun, Y. et al.** In vivo gene transfer of CD40 ligand into colon cancer cells induces local production of cytokines and chemokines, tumor eradication and protective antitumor immunity. *Gene Ther.*, 2000, vol. 7, 1467-76 **[0066]**
- **Godiska, R. et al.** Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med*, 1997, vol. 185, 1595-604 **[0066]**
- 20 • **Thomas, C.F. et al.** Acute direct adenoviral vector cytotoxicity and chronic, but not acute, inflammatory responses correlate with decreased vector-mediated transgene expression in the brain. *Mol Ther.*, 2001, vol. 3, 36-46 **[0068]**