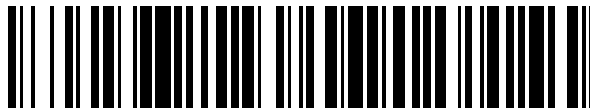


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 431**

51 Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 35/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01926498 .5**
96 Fecha de presentación: **30.03.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1267945**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2003**

54 Título: **CÉLULAS GENÉTICAMENTE MODIFICADAS QUE EXPRESAN UN INHIBIDOR DE TGF-BETA, SIENDO LAS CÉLULAS CÉLULAS DE CÁNCER DE PULMÓN.**

30 Prioridad:
31.03.2000 US 193497 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.02.2012

73 Titular/es:
NovaRx
6828 Nancy Ridge Drive, Suite 100
San Diego, CA 92121, US

72 Inventor/es:
FAKHRAI, Habib

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 373 431 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

Células genéticamente modificadas que expresan un inhibidor de TGF-beta, siendo las células células de cáncer de pulmón.

Antecedentes de la invención

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de células genéticamente modificadas que contienen una construcción genética que expresa un inhibidor de TGFβ eficaz para reducir la expresión de TGFβ, en las que las células genéticamente modificadas son células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) o de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), y a usos relacionados.

10 Descripción de la técnica relacionada

El cáncer de pulmón sigue siendo el cáncer más prevalente en el mundo occidental, representando el 30% de todas las muertes relacionadas con el cáncer (Ramanathan y Belani, 1997). El pronóstico actual para pacientes con cáncer de pulmón es malo. La tasa de curación global se estima en tan sólo el 13%. Se esperan aproximadamente 180.000 nuevos casos de cáncer de pulmón en los Estados Unidos en 1999. La mayoría de estos pacientes morirán debido a su enfermedad, esperándose 160.000 muertes por cáncer de pulmón a nivel nacional en 1999.

Existen dos subdivisiones importantes del cáncer de pulmón: cáncer de pulmón 1) de células no pequeñas (NSCLC) y 2) de células pequeñas (SCLC). Los enfoques de tratamiento y la historia natural difieren para estas dos enfermedades. La mayoría de casos (80%) de cáncer de pulmón en los Estados Unidos son NSCLC. Aunque se han producido avances en el entendimiento de factores de pronóstico y clínicos importantes tanto para NSCLC como para SCLC en los últimos 20 años, ha habido mejoras mínimas en los resultados terapéuticos. La única opción curativa para pacientes con NSCLC es terapia local (extirpación quirúrgica o irradiación local) en pacientes con enfermedad en estadio temprano (I y II) cuando el tumor está aún localizado. Sin embargo, en el diagnóstico la mayoría de pacientes con NSCLC presentan enfermedad avanzada, que no puede curarse mediante cirugía sola. En estadios avanzados de la enfermedad, la irradiación y/o quimioterapia sistémica pueden producir respuestas objetivas u alivio de síntomas, sin embargo, ofrecen sólo mejoras modestas en la supervivencia. La mediana de supervivencia de pacientes con enfermedad no resecable es de 6-12 meses. Las tasas de supervivencia a dos años para los estadios IIIB y IV de NSCLC son del 10,8 y el 5,4 por ciento respectivamente. Asimismo, las tasas de supervivencia a cinco años son del 3,9 y el 1,3 por ciento. Recientemente, varios fármacos nuevos están disponibles para el tratamiento de NSCLC incluyendo paclitaxel (Taxol), docetaxel (Taxotere), topotecán, irinotecán, vinorelbina y gemcitabina. Aunque estos fármacos son mejoras con respecto a agentes quimioterápicos anteriores (etopósido, cisplatino y carboplatino), la tasa de curación global sigue siendo baja.

El SCLC es un cáncer muy agresivo que se metastatiza tempranamente y a menudo, y tiene una mediana de supervivencia desde el diagnóstico de sólo dos a cuatro meses. Las formas de tratamiento localizado, tales como resección quirúrgica o radioterapia, muy rara vez producen supervivencia a largo plazo debido a la propensión de este cáncer a metástasis distante. Con la quimioterapia, la supervivencia puede prolongarse al menos de cuatro o cinco veces la tasa de supervivencia media para pacientes a los que no se les administra terapia, sin embargo, la supervivencia global a cinco años se mantiene en sólo el 5-10%.

Puesto que las modalidades terapéuticas actuales no mejoran significativamente la esperanza de vida en los estadios de pacientes con NSCLC o SCLC, se justifica la exploración de nuevos enfoques terapéuticos para estos pacientes.

El documento WO 96/002143 proporciona un método para prevenir o reducir la gravedad de un cáncer en un sujeto estimulando la respuesta inmunitaria del sujeto contra el cáncer. El documento WO 96/25178 proporciona un enfoque para tratar la fibrosis tisular que resulta de la acumulación inducida por TGF-β de matriz extracelular.

Sumario de la invención

Los pacientes que portan tumores de diferente origen histológico tienen niveles elevados de factores de crecimiento transformante β (TGFβ). Los TGFβ son factores de crecimiento que están asociados con la inmunosupresión. La supresión del sistema inmunitario de los pacientes da como resultado su incapacidad para reconocer y destruir tumores cuando aparecen por primera vez. Además, la supresión de la inmunidad de los pacientes los hace susceptibles a infecciones frecuentes. La inyección de células tumorales modificadas mediante ingeniería genética para bloquear su producción de TGFβ convierte a las células genéticamente modificadas en vacunas potentes que se reconocen por y pueden activar el sistema inmunitario contra el tumor. Activación del sistema inmunitario provoca posteriormente el reconocimiento y control de los tumores no modificados, originales en los organismos huésped. Este fenómeno se aplica en modelos tumorales animales y en ensayos clínicos en seres humanos. Por tanto, se propone usar este enfoque en pacientes con estadios de cánceres de pulmón de células no pequeñas y de células pequeñas.

Descripción detallada de la realización preferida

Los cánceres de pulmón representan el 30% de todas las muertes debidas a cáncer en los Estados Unidos (Ramanathan y Belani, 1997). La tasa de curación global para cáncer de pulmón es del 13% y el pronóstico actual para pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) sigue siendo malo.

Se ha documentado que pacientes con crecimiento tumoral progresivo tienen una función inmunitaria alterada (Jakowlew *et al.* 1995, Ransohoff *et al.* 1991; Holladay *et al.* 1992a; Holladay *et al.* 1992b). Esta alteración, comúnmente caracterizada como hiposensibilidad inmunitaria marcada, no se restringe únicamente a la inmunidad específica de tumor, sino que a su vez, a menudo se observa por todo el sistema inmunitario. La alteración es especialmente evidente en el compartimiento de células T o mediado por células y se caracteriza por linfopenia de células T y receptividad de células T alterada a estímulos tanto específicos de tumor como no específicos de tumor (Ransohoff *et al.* 1991). Un modo por el que los tumores pueden escapar de la vigilancia inmunitaria es expresando niveles inferiores de moléculas de MHC de clase I y clase II. Otros tumores pueden escapar aumentando la expresión de moléculas inmunosupresoras, tales como los TGF β . Es común observar tumores que utilizan una combinación de estos mecanismos.

La terapia génica ha recibido considerable atención en los últimos años. La vacunación con células tumorales diseñadas para aumentar la presentación de antígenos tumorales e inducir inmunidad antitumoral específica ha producido resultados prometedores pero limitados (Holladay *et al.* 1992). Los avances en el entendimiento de la biología del cáncer y los desarrollos en las tecnologías de vectores están haciendo progresar el potencial terapéutico de enfoques de vacunas tumorales. Ahora es posible modificar genéticamente células tumorales para vacunación para que expresen genes supresores de tumores específicos, moduladores inmunitarios, genes sensibles a fármacos y fragmentos génicos antisentido (Huber *et al.* 1991; Culver *et al.* 1992; Trojan *et al.* 1992; Dranoff *et al.* 1993; Ram *et al.* 1993; Trojan *et al.* 1993; Swisher *et al.* 1999). En estudios clínicos y preclínicos particulares se demuestra el potencial de los enfoques de terapia génica en el tratamiento del cáncer de pulmón. Modelos de cáncer de pulmón preclínicos han mostrado regresión de tumores establecidos e inmunogenicidad potenciada usando una línea de cáncer de pulmón alogénica genéticamente modificada para que exprese la citocina GM-CSF y un gen sensible a fármacos, timidina cinasa del virus del herpes simple mezclada con células dendríticas derivadas de la médula ósea singénica (Miller *et al.* 1998). Resultados preliminares de los ensayos clínicos de fase I en pacientes usando terapia génica retroviral muestra que la terapia génica se tolera bien y no tiene toxicidad (Swisher *et al.* 1998).

Los factores de crecimiento transformante beta (TGF β) son una familia de proteínas multifuncionales que regulan el crecimiento y la función de muchos tipos de células normales y neoplásicas (Sporn *et al.* 1986; Massague 1987; Border y Rouslahti 1992; Jachimczak *et al.* 1993). Ejercen un amplia gama de efectos en una variedad de tipos de células y se ha mostrado que estimulan o inhiben el crecimiento celular, inducen la apoptosis y aumentan la angiogénesis (Merzak *et al.* 1994; Jennings *et al.* 1994; Ashley *et al.* 1998a; Ashley *et al.* 1998b; Jennings *et al.* 1998). Estos efectos están mediados al nivel de la transducción de señales. Se ha encontrado que la transducción de señales de TGF β afecta a la expresión de más de 20 genes diferentes (Baker y Harland 1997; Heldin *et al.* 1997; Stiles 1997; Yingling *et al.* 1997).

El TGF β existe en tres isoformas, conocidas como TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3. Sus secuencias de aminoácidos presentan homologías del orden del 70-80%. Las proteínas de TGF β humano y los genes que codifican las mismas se conocen en la técnica. Específicamente, se han documentado ARNm de TGF β 1 (número de registro de GenBank XM_008912 y NM_000660), ARNm de TGF β 2 (número de registro de GenBank XM_001754 y NM_003238) y ARNm de TGF β 3 (número de registro de GenBank XM_007417) de fuentes humanas.

Las proteínas receptoras de TGF β pueden ser de tipo I (55 kDa) o tipo II (70 kDa). Las proteínas receptoras de TGF β y los genes que codifican las mismas también se conocen en la técnica. Se describen en la técnica ARNm del receptor de TGF β humano de tipo I (número de registro de GenBank XM_005591) y ARNm de receptor de TGF β humano de tipo II (número de registro de GenBank XM_003094).

Las citocinas de la superfamilia de TGF β se unen a receptores serina/treonina cinasa específicos y transmiten señales intracelulares a través de proteínas Smad. Tras la estimulación con ligando, las Smad se desplazan al núcleo y funcionan como componentes de complejos de transcripción. La señalización de TGF β se regula positiva y negativamente a través de diversos mecanismos. La regulación positiva amplifica señales a un nivel suficiente para la actividad biológica. La regulación negativa se produce a los niveles extracelular, de membrana, citoplasmático y nuclear.

Muchos tumores, incluyendo NSCLC y SCLC, producen altos niveles de TGF β activo (Constam *et al.* 1992; Eastham *et al.* 1995; Friedman *et al.* 1995; Jakowlew *et al.* 1995; Kong *et al.* 1995; Yamada *et al.* 1995; Eder *et al.* 1996). Niveles de TGF β elevados también se han relacionado con inmunosupresión (Sporn *et al.* 1986; Massague 1987; Bodmer *et al.* 1989; Border y Rouslahti 1992; Chen *et al.* 1997). El TGF β inhibe la activación de células T en respuesta a estimulación antigénica. Adicionalmente, el TGF β tiene efectos antagonistas sobre las células

5 citotóxicas naturales (NK) así como la inducción y proliferación de las células citotóxicas activadas por linfocinas (LAK) (Rook *et al.* 1986; Kasid *et al.* 1988; Tsunawaki *et al.* 1988; Hirte *et al.* 1991; Ruffini *et al.* 1993; Naganuma *et al.* 1996). Apoyando esto, se ha demostrado una relación entre los niveles de TGF β y la supervivencia en cáncer de colon (Friedman *et al.* 1995). Las tasas de recidiva eran 18 veces mayores en pacientes cuyo tumor producía altos niveles de TGF β en comparación con aquéllos cuyo tumor producía bajos niveles. Esta relación era independiente del estado de los ganglios y el grado de diferenciación del tumor primario.

10 Dado el papel de TGF β en la supresión inmunitaria, se propuso evaluar el efecto de inhibición de TGF β mediante vacunación con tumor de NSCLC. Usando un enfoque de inhibidor de TGF β se transfectaron varias células de NSCLC con antisentido de TGF β , seleccionado de TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3, y mezclas de los mismos. Se escogió el antisentido de TGF β 2 puesto que demostró superioridad en la regulación por disminución de la expresión de TGF β en comparación con TGF β 1 o una combinación de TGF β 1 y TGF β 2. Estas células de NSCLC genéticamente modificadas se irradiaron entonces para prevenir la proliferación y se inyectaron en varios sujetos con tumores animales diferentes. Se observó que las células de NSCLC previamente ineficaces como componente de una vacuna podrían volverse eficaces a través de una modificación genética de este tipo. El bloqueo de la expresión de TGF β aumentó la inmunogenicidad de estos animales. Además, tales vacunaciones erradicaron tumores previamente implantados y protegieron a los animales frente a la exposición a tumores.

20 Dado el papel de TGF β en la supresión inmunitaria, se prevé evaluar el efecto de inhibición de TGF β mediante vacunación con tumor de SCLC. Usando un enfoque de inhibidor de TGF β , se prevé transfectar varias células de SCLC con antisentido de TGF β , seleccionado de TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3, y mezclas de los mismos. Estas células de SCLC genéticamente modificadas se irradian entonces para prevenir la proliferación y se inyectan en varios sujetos con tumores animales diferentes. Se prevé observar que las células de SCLC previamente ineficaces como componentes de una vacuna volverían eficaces a través de una modificación genética de este tipo. Se prevé que el bloqueo de la expresión de TGF β que aumentará la inmunogenicidad de estos animales. Además se prevé que tales vacunaciones erradicarán tumores previamente implantados y protegerán a los animales frente a la exposición a tumores.

25 Se ha mostrado la eficacia de este enfoque en un modelo de tumor de NSCLC. En el modelo de tumor de NSCLC KLN-205, se vacunaron ratones DB2 con dos inyecciones de 5×10^5 células de NSCLC autólogas genéticamente modificadas con gen antisentido de TGF β 2 irradiadas. Esto pudo proteger a los animales frente a una exposición intraperitoneal a tumores (i.p.) posterior con 10^6 células de NSCLC KLN-205 no modificadas. En experimentos de erradicación en este modelo de tumor de cáncer de pulmón, la vacunación de animales que portan tumores de una semana de edad, con células modificadas con gen antisentido de TGF β 2 dio como resultado regresión tumoral marcada y supervivencia libre de tumor prolongada en comparación con el grupo control.

30 Fakhrai *et al.* 1996 demostraron la eficacia de este enfoque en un tumor glial de rata. En el modelo de tumor de gliosarcoma 9L, la implantación intracraneal de tan sólo 300 células tumorales en ratas Fisher-344 dio como resultado más del 99% de mortalidad tras seis semanas. Fakhrai *et al.* 1996 implantaron 5×10^3 células tumorales en el cerebro de ratas y administraron vacunaciones con tumor. Los animales inmunizados con células 9L modificadas con antisentido de TGF β 2, o con células 9L modificadas con antisentido de TGF β 2 genéticamente modificadas para secretar IL-2 permanecieron libres de tumor durante la duración del estudio (24 de un total de 24 o 100% de supervivencia libre de tumor). En cambio, la mayoría del grupo control (2 de un total de 15) inmunizados con células que contienen el vector vacío desarrollaron tumores y tuvieron que sacrificarse en el plazo de cinco semanas (supervivencia libre de tumor del 13%, $p < 0,01$).

35 Liau *et al.* 1998 demostraron una eficacia comparable de la terapia génica antisentido con TGF β 2 en un modelo de tumor de glioma C-6 de rata. Dorigo *et al.* 1998 mostraron la eficacia de este enfoque en un modelo de tumor de teratoma de ovarios murino (MOT); sin embargo, sólo el grupo inoculado con células genéticamente modificadas con IL-2 y antisentido de TGF β dieron como resultado una protección significativa frente a una exposición a tumores posterior, estableciendo por tanto el empirismo del enfoque. Otros grupos han demostrado efectos antitumorales similares de la terapia génica con TGF β en células cultivadas y modelos tumorales animales (Kim *et al.* 1997).

40 La terapia génica ha recibido considerable atención en los últimos años. La vacunación con células tumorales diseñadas para aumentar la presentación de antígenos tumorales e inducir inmunidad antitumoral específica ha producido resultados prometedores pero limitados. Los avances en el entendimiento de la biología del cáncer y los desarrollos en las tecnologías de vectores están haciendo progresar el potencial terapéutico de la vacunación con tumores. Ahora es posible modificar genéticamente células tumorales para la vacunación para que expresen genes supresores de tumor específicos, moduladores inmunitarios, genes sensibles a fármacos o fragmentos génicos antisentido (Huber *et al.* 1991; Culver *et al.* 1992; Trojan *et al.* 1992; Dranoff *et al.* 1993; Ram *et al.* 1993; Trojan *et al.* 1993).

55 Varios estudios clínicos han evaluado células tumorales alogénicas genéticamente modificadas como componentes primarios de tratamientos inmunoterapéuticos para cánceres de cerebro, piel, colon y mama. Se ha mostrado que los regímenes de vacunación son seguros y que generan respuestas inmunitarias antivacuna celulares y humorales.

Los resultados preliminares de varios ensayos clínicos de fase I usando terapias génicas en pacientes con NSCLC también han demostrado la seguridad de los enfoques de terapias génicas para esta población de pacientes (Dubinett, 1998; Roth, 1998; Swisher *et al.* 1998) así como una población de pacientes con SCLC.

5 Varios grupos han demostrado experiencia en el campo de terapia génica, tanto en varios modelos de tumores animales como en la clínica. (Por ejemplo, Fakhrai *et al.* 1995; Sobol *et al.* 1999.) La FDA ha aprobado previamente al menos cuatro IND que han sometido a investigación la vacunación modificada genéticamente en pacientes con cáncer:

- 10 • Sobol *et al.*, BB-IND n.º 5812: "Injection of colon carcinoma patients with autologous irradiated tumor cells and fibroblasts genetically modified to secrete interleukin-2 (IL-2). A Phase I study"
- 15 • Sobol *et al.*, BB-IND n.º 4840: "Active immunotherapy of glioblastoma with tumor cells or fibroblasts genetically modified to secrete interleukin-2 (IL-2)"
- Sobol *et al.*, BB-IND n.º 7483: "A Phase I Study of Allogeneic Tumor Cells Genetically Modified to Express B7.1 (CD80) Mixed with Allogeneic Fibroblasts Genetically Modified to Secrete IL-2 in Patients with Colorectal Carcinoma"
- Fakhrai *et al.* BB-IND n.º 6658: "Proposal for a Phase I Clinical Trial: A Phase I Study of the Safety of Injecting Malignant Glioma Patients with Irradiated TGFβ2 Antisense Gene-Modified Autologous Tumor Cells"

20 En el documento BB-IND n.º 6658, la FDA aprobó una IND de fase I que evaluaba la terapia génica antisentido de TGFβ2 en pacientes con glioma de alto grado. Los pacientes se vacunaron con células tumorales de glioma autólogas genéticamente modificadas con el plásmido antisentido de TGFβ2 para bloquear la expresión de TGFβ2. La terapia consistía en inyecciones intradérmicas con 5×10^8 , 1×10^7 o 2×10^7 células cada 3 semanas durante los primeros 4 meses y cada 1-2 meses después de eso. Hasta la fecha, se han tratado 5 pacientes. En el mismo IND, 25 la FDA aprobó el uso compasivo de una línea celular de glioma alogénica de haplotipo parcialmente coincidente que estaba genéticamente modificada con el mismo vector antisentido de TGFβ2 en un paciente con glioma pediátrico.

El tratamiento global se ha tolerado bien notificándose sólo toxicidades transitorias, de bajo grado. No se han observado reacciones adversas significativas en los sitios de inmunización ni anomalías relacionadas con el tratamiento al monitorizar los recuentos de sangre completa, las químicas séricas y los análisis de orina. En algunos 30 casos se ha observado eritema leve, transitorio en los sitios de inyección tras la segunda y tercera inyecciones subcutáneas con células tumorales autólogas modificadas con gen antisentido de TGFβ2.

Se han observado niveles aumentados de infiltrados de células efectoras CD3+, CD4+ y CD8+ en el sitio de inyección y en biopsias de tumor secundario. La histología inmunitaria de tumores y biopsias de los sitios de inyección obtenidos en operación posterior demuestra un número significativamente superior de infiltrados 35 inmunitarios en comparación con biopsias tomadas antes del inicio de la terapia génica.

De los 5 pacientes tratados, 1 paciente demostró una respuesta clínica, 2 demostraron respuesta inmunitaria potenciada, 1 mostró progresión tumoral mientras que el quinto paciente aún se está sometiendo a la terapia. En el paciente que tuvo una respuesta clínica, las exploraciones de IRM globales realizadas a intervalos de aproximadamente 6 semanas durante los primeros tres meses de tratamiento revelaron cambios modestos en el 40 tamaño tumoral global. Pudo observarse crecimiento y decrecimiento del edema peritumoral asociado con alteraciones en las dosis de Decadron. Sin embargo, las exploraciones de IRM mostraron regresión tumoral a los siete meses con una mejora adicional en la respuesta 3 meses después.

Por tanto, el ensayo clínico de fase I demostró la seguridad de inyectar a pacientes 5×10^6 , 1×10^7 o 2×10^7 células tumorales de haplotipo coincidente o autólogas modificadas con gen antisentido de TGFβ2. Además, es alentador 45 observar respuestas clínicas preliminares e inmunogenicidad potenciada observadas con este régimen de vacunación. Se contempla la aplicación de este enfoque de terapia génica en pacientes con NSCLC o SCLC.

La invención abarca composiciones y usos para prolongar la supervivencia de un sujeto que tiene un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) o un cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de células genéticamente modificadas que contienen una 50 construcción genética que expresa un inhibidor de TGFβ eficaz para reducir la expresión de TGFβ, en los que las células genéticamente modificadas son células de NSCLC o SCLC. Cualquier método que neutralice TGFβ o inhiba la expresión del gen de TGFβ (o bien transcripción o bien traducción) puede usarse para efectuar la supervivencia del sujeto. Tales enfoques también pueden ser útiles para aplicaciones de tratamiento, es decir, para tratar NSCLC o SCLC.

55 En una realización, pueden diseñarse modalidades de supervivencia para reducir el nivel de expresión génica de TGFβ endógeno, por ejemplo, usando enfoques antisentido o de ribozimas para reducir o inhibir la traducción de transcritos de ARNm de TGFβ; enfoques de triple hélice para inhibir la transcripción del gen de TGFβ; o recombinación homóloga dirigida para inactivar o "desactivar" el gen de TGFβ o su promotor endógeno.

Los enfoques antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (o bien ADN o bien ARN) que son complementarios al ARNm de TGFβ. Los oligonucleótidos antisentido se unirá a los transcritos de ARNm de TGFβ complementarios e impedirán la traducción. No se requiere, aunque se prefiere, complementariedad absoluta. Una secuencia "complementaria" a una parte de un ARN, tal como se denomina en el presente documento, se refiere a una secuencia que tiene suficiente complementariedad como para poder hibridar con el ARN, formando un dúplex estable; en el caso de ácido nucleicos antisentido bicatenarios, una única hebra del ADN dúplex puede someterse a prueba así, o puede someterse a ensayo la formación de tríplex. La capacidad para hibridar dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto más largo sea el ácido nucleico de hibridación, más apareamientos erróneos de bases con un ARN puede contener y aún forma un dúplex estable (o tríplex, como puede ser el caso). Un experto en la técnica puede determinar un grado tolerable de apareamientos erróneos mediante el uso de procedimientos convencionales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

Oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del mensajero, por ejemplo, la secuencia no traducida en 5' hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG, deben funcionar lo más eficazmente en la inhibición de la traducción. Sin embargo, se ha mostrado que secuencias complementarias a las secuencias no traducidas en 3' de los ARNm son eficaces en la inhibición de la traducción de los ARNm también. Véase en general, Wagner, R., 1994, Nature 372:333-335. Por tanto, podrían usarse oligonucleótidos complementarios a las regiones no codificantes, no traducidas o bien en 5' o bien en 3' de TGFβ en un enfoque antisentido para inhibir la traducción de ARNm de TGFβ endógeno. Los oligonucleótidos complementarios a la región no traducida en 5' del ARNm deben incluir el complemento del codón de iniciación AUG. También podrían usarse oligonucleótidos antisentido complementarios a regiones codificantes de ARNm según la invención. Ya se diseñe para hibridarse con los extremos 5', 3' o la región codificante de ARNm de TGFβ, los ácidos nucleicos antisentido deben tener al menos seis nucleótidos de longitud, y son preferiblemente oligonucleótidos que oscilan entre 6 y aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En aspectos específicos el oligonucleótido tiene al menos 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos.

Independientemente de la elección de la secuencia diana, se prefiere que se realicen en primer lugar estudios *in vitro* para cuantificar la capacidad del oligonucleótido antisentido para inhibir la expresión génica. Se prefiere que estos estudios utilicen controles que distinguen entre inhibición de gen antisentido y efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También se prefiere que estos estudios comparen niveles de la proteína o ARN diana con los de una proteína o ARN de control interno. Adicionalmente, se prevé que los resultados obtenidos usando el oligonucleótido antisentido se comparen con los obtenidos usando un oligonucleótido de control. Se prefiere que el oligonucleótido de control sea de aproximadamente la misma longitud que el oligonucleótido de prueba y que la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido difiera de la secuencia antisentido no más de lo que sea necesario para prevenir la hibridación específica con la secuencia diana.

Los oligonucleótidos pueden ser ADN o ARN o mezclas químicas o derivados o versiones modificados de los mismos, monocatenarios o bicatenarios. El oligonucleótido puede modificarse en el resto de base, el resto de azúcar o la estructura principal de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos adjuntos tales como péptidos (por ejemplo, para seleccionar como diana receptores de célula huésped), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556; Lemaitre *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; publicación PCT n.º WO88/09810, publicada el 15 de diciembre de 1988).

El oligonucleótido antisentido puede comprender al menos un resto de base modificada que se selecciona del grupo que incluye pero no se limita a 5-fluoruracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metiluracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina.

El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos un resto de azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye pero no se limita a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

Aún en otra realización, el oligonucleótido antisentido comprende al menos una estructura principal de fosfato modificada seleccionada del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un alquilfosfotriéster y un formacetal o análogo de los mismos.

Los oligonucleótidos de la invención pueden sintetizarse mediante métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado (tal como están disponibles comercialmente de Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, pueden sintetizarse oligonucleótidos de fosforotioato mediante el método de Stein *et al.* (1988, Nucl. Acids Res. 16:3209), pueden prepararse oligonucleótidos de

metilfosfonato mediante el uso de soportes de polímero de vidrio de poro controlado (Sarin *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451), etc.

5 Sin embargo, a menudo es difícil lograr concentraciones intracelulares del antisentido suficientes para suprimir la traducción de los ARNm endógenos. Por tanto, un enfoque conveniente utiliza una construcción de ADN
 10 recombinante en el que la secuencia antisentido se coloca bajo el control de un promotor fuerte. El uso de una construcción de este tipo para transfectar células diana dará como resultado la transcripción de cantidades suficientes de los ARN monocatenarios que formarán pares de bases complementarias con los transcritos de TGFβ endógenos y de ese modo impedirán la traducción del ARNm de TGFβ. Por ejemplo, puede introducirse un vector de
 15 manera que se capte por una célula y dirija la transcripción de un ARN antisentido. Un vector de este tipo puede mantenerse episomal o integrarse cromosómicamente, siempre que pueda transcribirse para producir el ARN antisentido deseado. Tales vectores pueden construirse mediante métodos de tecnología de ADN recombinante convencionales en la técnica. Los vectores pueden ser plásmidos, virales u otros conocidos en la técnica, usados para la replicación y expresión en células de mamífero. La expresión de la secuencia que codifica el ARN antisentido puede ser mediante cualquier promotor conocido en la técnica para actuar en células de mamífero, preferiblemente humanas. Tales promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Tales promotores incluyen pero no se limitan a: la región promotora temprana de SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, Nature 290:304-310), el promotor contenido en la repetición terminal larga en 3' de virus del sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.*, 1980, Cell 22:787-797), el promotor de timidina cinasa del herpes (Wagner *et al.*, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster *et al.*, 1982, Nature 296:39-42), etc.

20 También pueden usarse moléculas de ribozima diseñadas para escindir catalíticamente transcritos de ARNm de TGFβ para impedir la traducción de ARNm de TGFβ y la expresión de TGFβ. (Véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT WO90/11364, publicada el 4 de octubre del 1990; Sarver *et al.*, 1990, Science 247:1222-1225). Aunque pueden usarse ribozimas que escinden ARNm en secuencias de reconocimiento específico de sitio para destruir los ARNm de TGFβ, se prefiere el uso de ribozimas cabeza de martillo. Las ribozimas cabeza de martillo
 25 escinden los ARNm en ubicaciones dictadas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarias con el ARNm diana. El único requisito es que el ARNm diana tenga la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas cabeza de martillo se conoce bien en la técnica y se describe más completamente en Haseloff y Gerlach, 1988, Nature, 334:585-591. Existen cientos de sitios de escisión de ribozimas cabeza de martillo posibles dentro de la secuencia de nucleótidos de un ADNc de TGFβ. Preferiblemente, la ribozima se modifica mediante ingeniería genética de modo que el sitio de reconocimiento de escisión se ubique cerca del extremo 5' del ARNm de TGFβ; es decir, para aumentar la eficacia y minimizar la acumulación intracelular de transcritos de ARNm no funcionales.

35 Las ribozimas de la presente invención también incluyen ARN endorribonucleasas (a continuación en el presente documento "ribozimas tipo Cech") tal como la que se produce de manera natural en *Tetrahymena thermophila* (conocida como la IVS, o L-19 IVS ARN) y que se ha descrito extensamente por Thomas Cech y colaboradores (Zaug, *et al.*, 1984, Science, 224:574-578; Zaug y Cech, 1986, Science, 231:470-475; Zaug, *et al.*, 1986, Nature, 324:429-433; solicitud de patente internacional publicada n.º WO 88/04300 por University Patents Inc.; Been y Cech, 1986, Cell, 47:207-216). Las ribozimas tipo Cech tienen un sitio activo de ocho pares de bases que se hibrida con una secuencia de ARN diana tras lo cual tiene lugar la escisión del ARN diana. La invención abarca las ribozimas tipo Cech que seleccionan como diana secuencias de sitios activos de ocho pares de bases que están presentes en TGFβ.

45 Como en el enfoque antisentido, las ribozimas pueden estar compuestas por oligonucleótidos modificados (por ejemplo para lograr una estabilidad, selección como diana, etc. mejoradas) y deben suministrarse para seleccionar como diana células que expresan TGFβ. Un método conveniente de suministro implica usar una construcción de ADN que codifica la ribozima bajo el control de un promotor fuerte de modo que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir mensajeros de TGFβ endógenos e inhibir la traducción. Debido a que las ribozimas, a diferencia de las moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una concentración intracelular inferior para lograr eficacia.

50 La expresión génica de TGFβ endógeno también puede reducirse inactivando o "desactivando" al gen de TGFβ o su promotor usando recombinación homóloga dirigida. (Por ejemplo, véanse Smithies *et al.*, 1985, Nature 317:230-234; Thomas y Capecchi, 1987, Cell 51:503-512; Thompson *et al.*, 1989 Cell 5:313-321). Por ejemplo, puede usarse un TGFβ no funcional, mutante (o una secuencia de ADN completamente no relacionada) flanqueada por ADN homólogo al gen de TGFβ endógeno (o bien las regiones reguladoras o bien las regiones codificantes del gen de TGFβ), con o sin un marcador seleccionable y/o un marcador seleccionable negativo, para transfectar células diana que expresan TGFβ. La inserción de construcción de ADN, mediante recombinación homóloga dirigida, da como resultado la inactivación del gen de TGFβ.

Alternativamente, la expresión génica de TGFβ endógeno puede reducirse seleccionando como diana secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen de TGFβ (es decir, el promotor y/o potenciadores de TGFβ) para formar estructuras de triple hélice que impiden la transcripción del gen de TGFβ en

células dianas. (Véanse en general, Helene, C. 1991, *Anticancer Drug Des.*, 6(6):569-84; Helene, C., *et al.*, 1992, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660:27-36; y Maher, L. J., 1992, *Bioassays* 14(12):807-15).

5 Aún en otra realización de la invención, la actividad de TGF β puede reducirse usando un enfoque “negativo dominante” para efectuar la supervivencia del sujeto. Para este fin, pueden usarse construcciones genéticas que codifican TGF β defectuosos para disminuir la actividad de TGF β en células vecinas. Por ejemplo, pueden introducirse en células diana secuencias de nucleótidos que dirigen la expresión de TGF β en los que se delecionan o se mutan dominios. Alternativamente, puede utilizarse recombinación homóloga dirigida para introducir tales delecciones o mutaciones en el gen de TGF β endógeno de la célula diana. La células modificadas mediante ingeniería genética expresaran citocinas no funcionales (es decir, una citocina que puede unirse a su receptor natural, pero no puede transducir señales). Tales células modificadas mediante ingeniería genética deberán facilitar una respuesta disminuida en células vecinas al ligando de TGF β endógeno, dando como resultado la supervivencia del sujeto.

15 En una realización alternativa, la administración de construcciones genéticas que codifican péptidos solubles, proteínas, proteínas de fusión o anticuerpos que se unen a y “neutralizan” TGF β intracelular efectúan la supervivencia del sujeto. Para este fin, pueden utilizarse construcciones genéticas que codifican péptidos que corresponden a dominios del receptor de TGF β , mutantes de delección del receptor de TGF β , o cualquiera de estos mutantes o dominios de receptor de TGF β fusionados a otro polipéptido (por ejemplo, un polipéptido de IgFc). Alternativamente, pueden usarse construcciones genéticas que codifican anticuerpos anti-idiotípicos o fragmentos Fab de anticuerpos anti-idiotípicos que imitan al receptor de TGF β y neutralizan TGF β . Tales construcciones genéticas que codifican estos Fab, anticuerpos anti-idiotípicos, proteínas de fusión, proteínas o péptidos de receptor de TGF β se administran para neutralizar TGF β y efectuar la supervivencia del sujeto.

25 Las construcciones genéticas que codifican anticuerpos que reconocen específicamente uno o más epítomos de TGF β , o epítomos de variantes conservadas de TGF β , o fragmentos de péptidos de TGF β también se abarcan por la invención. Tales anticuerpos incluyen pero no se limitan a anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos quiméricos o humanizados, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab y fragmentos de unión a epítomo de cualquiera de los anteriores. Pueden usarse construcciones genéticas que codifican tales anticuerpos como método para la inhibición de la actividad de TGF β y efectuar la supervivencia del sujeto.

30 Para la producción de anticuerpos, pueden inmunizarse diversos animales huésped mediante inyección con TGF β , un péptido de TGF β , TGF β truncado, equivalentes funcionales de TGF β o mutantes de TGF β . Tales animales huésped pueden incluir pero no se limitan a conejos, ratones y ratas, por nombrar algunos. Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de los animales inmunizados.

35 Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos frente a un antígeno particular, mediante cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Éstas incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma de Kohler y Milstein, (1975, *Nature* 256:495-497; y la patente estadounidense n.º 4.376.110), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4:72; Cole *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030), y la técnica de hibridoma de EBV (Cole *et al.*, 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 77-96 págs.77-96). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas.

45 Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos quiméricos” (Morrison *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81:6851-6855; Neuberger *et al.*, 1984, *Nature*, 312:604-608; Takeda *et al.*, 1985, *Nature*, 314:452-454) mediante corte y empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes partes se derivan de diferentes especies animales, tales como los que tienen una región variable derivada de un AcM murino y una región constante de inmunoglobulina humana.

50 Alternativamente, pueden adaptarse técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente estadounidense n.º 4.946.778; Bird, 1988, *Science* 242:423,426; Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; y Ward *et al.*, 1989, *Nature* 334:544-546) para producir anticuerpos de cadena sencilla contra productos génicos de TGF β . Los anticuerpos de cadena sencilla se forman uniendo los fragmentos de cadena ligera y pesada de la región Fv mediante un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de cadena sencilla.

55 Pueden generarse fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab (Huse *et al.*, 1989, *Science*, 246:1275-1281) para permitir la identificación fácil y rápida de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

Adicionalmente, las enzimas que escinden precursores de TGF β para dar las isoformas activas pueden inhibirse con el fin de bloquear la activación de TGF β . El TGF β debe activarse para que presente sus efectos biológicos y se requieren enzimas para escindir la proteína precursora. Estas enzimas pueden alterarse genéticamente para impedir la interacción con la proteína precursora, impidiendo la escisión de la proteína para dar su forma madura. La transcripción o traducción de estas enzimas puede bloquearse mediante medios conocidos en la técnica. Estas enzimas pueden inhibirse alternativamente mediante cualquier medio conocido por el experto en la técnica.

Los TGF β se unen a receptores serina/treonina cinasa y transmiten señales intracelulares a través de proteínas Smad. La transducción de señales puede interrumpirse con el fin de reprimir la señalización iniciada por TGF β . Alterando la transducción de señales es posible impedir el efecto inmunosupresor de TGF β . Esto puede lograrse mediante cualquier medio conocido en la técnica en el que la interacción entre el receptor de TGF β y la proteína Smad se antagoniza o se impide, incluyendo la administración de células genéticamente modificadas que expresan proteínas que bloquean o compiten con las interacciones del receptor de TGF β y la proteína Smad. Alternativamente, la transcripción o traducción del receptor de TGF β o la proteína Smad puede alterarse mediante cualquier medio conocido en la técnica con el fin de impedir la transmisión de señales a lo largo de la ruta de señalización.

Se administran células diana modificadas mediante ingeniería genética para que expresen una forma de este tipo de inhibidor de TGF β como inmunógeno a pacientes con NSCLC o SCLC, tras lo cual servirán para potenciar respuestas inmunitarias antitumorales y de ese modo prolongar la supervivencia de sujetos que portan tumores. Tales células pueden obtenerse del paciente (autólogas) o un donante (alógenas o xenogénicas). Para un paciente con NSCLC, las células modificadas mediante ingeniería genética constituyen células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), que son células de NSCLC en virtud de derivarse de un NSCLC o que imitan un NSCLC (es decir, que tienen epítomos o antígenos tumorales comunes compartidos con un NSCLC primario). Alternativamente, para un paciente con SCLC, las células modificadas mediante ingeniería genética constituyen células de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), que son células SCLC en virtud de derivarse de un SCLC o que imitan un SCLC (es decir, que tiene epítomos o antígenos tumorales comunes compartidos con un SCLC primario).

Las células autólogas son células que se derivan del mismo individuo. Las células alogénicas son células que se derivan de otro individuo de la misma especie de modo que las células tienen variaciones genéticas intraespecie. Las células xenogénicas son células que se derivan de un individuo de una especie diferente de modo que las células tienen diferencias antigénicas interespecie.

En una realización, se escoge una línea celular tumoral de SCLC o NSCLC alogénica (o xenogénica) como inmunógeno. Se ha mostrado que las líneas celulares de tumor de pulmón tienen epítomos compartidos con tumores primarios (Takenoyama *et al.* 1998). Estos investigadores mostraron que CTL restringidos por MHC de clase I generados contra una línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano tenía citotoxicidad demostrable contra otra línea celular de tumor de pulmón. La reactividad cruzada en estos experimentos se bloqueó mediante anticuerpos monoclonales anti-CD8 y anti-MHC de clase I, lo que sugiere que existen antígenos tumorales comunes compartidos entre las células de cáncer de pulmón.

En otra realización, se usa como un inmunógeno un cóctel de células alogénicas (o xenogénicas) en pacientes con NSCLC o SCLC. Puede emplearse más de una, por ejemplo, dos, tres, cuatro o más líneas celulares en vez de una para aumentar el número total de antígenos tumorales presentes.

Además, las células diana tendrán bajos niveles de expresión de TGF β debido a la transfección con una construcción genética que codifica un inhibidor de TGF β 2. La supresión de la expresión de TGF β por las células tumorales eliminará una fuente principal de supresión inmunitaria operativa en el sitio de inyección de la vacuna. Una respuesta inmunitaria local, dirigida contra las células tumorales inyectadas, inducirá una respuesta inmunitaria sistémica contra el tumor nativo de los pacientes.

Las células diana se modifican mediante ingeniería genética *in vitro* usando técnicas de ADN recombinante para introducir las construcciones genéticas en las células, por ejemplo, mediante procedimientos de transducción (usando vectores virales) o de transfección, incluyendo pero sin limitarse a el uso de plásmidos, cósmidos, YAC, electroporación, liposomas, etc. Las células modificadas mediante ingeniería genética pueden introducirse en el paciente, por ejemplo, en la circulación, por vía intraperitoneal, por vía intradérmica, por vía subcutánea, en los lóbulos del pulmón. Alternativamente, las células pueden incorporarse en una matriz e implantarse en el cuerpo como parte de un injerto de tejido.

En otra realización, las células diana se modifican mediante ingeniería genética para expresar una secuencia codificante para una o más citocinas. En una alternativa, se introduce un vector de expresión que codifica individualmente para la una o más citocinas en las células diana. En otra alternativa, se introduce un vector de expresión que codifica de manera doble para la una o más citocinas y un inhibidor de TGF β en las células diana. Todavía en otra alternativa, algunas células diana se modifican mediante ingeniería genética para que expresen una secuencia codificante para una o más citocinas y otras células diana se modifican genéticamente para que expresen

- 5 un inhibidor de TGF β . Mediante la administración conjunta del agente inmunoestimulador junto con la inhibición del TGF β inmunosupresor, puede mejorarse la respuesta inmunitaria de un sujeto frente a células tumorales. Los ejemplos de citocinas útiles para la práctica de la presente invención incluyen interleucina 1, interleucina 2, interleucina 3, interleucina 4, interleucina 5, interleucina 6, interleucina 7, interleucina 8, interleucina 9, interleucina 10, interleucina 11, interleucina 12, interleucina 15, interferón-alfa, interferón-gamma, factor de necrosis tumoral alfa, factor de crecimiento transformante beta, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos y factor estimulante de colonias de granulocitos. El nivel de expresión de citocinas debe regularse de manera que la inmunidad antitumoral pueda aumentarse sin producir toxicidad sistémica significativa en el sujeto.
- 10 Cuando las células diana que van a administrarse son células no autólogas, pueden administrarse usando técnicas bien conocidas que impiden el desarrollo de una respuesta inmunitaria del huésped contra las células introducidas. Por ejemplo, las células pueden introducirse en una forma encapsulada que, mientras permite un intercambio de componentes con el entorno extracelular inmediato, no permite que las células introducidas se reconozcan por el sistema inmunitario del huésped.
- 15 La toxicidad y eficacia terapéutica de las células de NSCLC o SCLC puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La razón de dosis entre efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y puede expresarse como la razón DL50/DE50. Se prefieren números de células de NSCLC o SCLC que presenten índices terapéuticos altos.
- 20 Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación para seres humanos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones que incluyen la DE50 con poca o sin toxicidad. Para cualquier número de células de NSCLC o SCLC usadas en la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Puede formularse una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración que incluye la CI50 (es decir, la concentración del material de prueba que logra una inhibición de síntomas de la mitad de la máxima) tal como se determina en cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar de manera más precisa dosis útiles en seres humanos.
- 25 Pueden formularse composiciones farmacéuticas para su uso según la presente invención de una manera convencional usando uno o más excipientes o portadores fisiológicamente aceptables. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, incluyendo QS-21, Detox-PC, MPL-SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL-1005, GERBU, TERamide, PSC97B, Adjumer, PG-026, GSK-1, GcMAF, B-alethine, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, Betafectin, alumbre y MF59 (véase Kim *et al.* Vaccine 2000, 18: 597 y referencias en el mismo). Las formulaciones para las inyecciones pueden presentarse en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o recipientes de múltiples dosis.
- 30 La presente invención proporciona adicionalmente una composición terapéutica que comprende las células genéticamente modificadas que expresan un inhibidor de TGF β y un portador terapéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, un portador terapéuticamente aceptable incluye cualquiera y todos los disolventes, incluyendo agua, medios de dispersión, medios de cultivo de células, agentes isotónicos y similares que no sean tóxicos para el huésped. De manera conveniente, es una disolución tamponada isotónica acuosa con un pH de aproximadamente 7,0. El uso de tales medios y agentes en composiciones terapéuticas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con las células genéticamente modificadas de la presente invención, se contempla el uso de tal agente o medio convencional en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones.
- 35 Las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden administrarse a un animal que las necesita. Por consiguiente, la presente invención proporciona usos para inducir una respuesta inmunitaria en un animal que necesita tal respuesta, que comprende administrar a un animal una cantidad inmunológicamente eficaz de las células genéticamente modificadas objeto. La presente invención también proporciona usos para prevenir o tratar un tumor en un animal, que comprenden administrar a un animal una cantidad antitumoral eficaz de las células genéticamente modificadas objeto.
- 40 El término "animal" usado en el presente documento abarca todos los mamíferos, incluyendo el ser humano. Preferiblemente, el animal de la presente invención es un sujeto humano.
- 45 La respuesta inmunitaria inducida en el animal administrando las células genéticamente modificadas objeto puede incluir respuestas inmunitarias celulares mediadas principalmente por células T citotóxicas, que pueden destruir células tumorales, así como respuestas inmunitarias humorales mediadas principalmente por células T auxiliares, que pueden activar a las células B conduciendo así a la producción de anticuerpos. Puede usarse una variedad de técnicas para analizar el tipo de respuestas inmunitarias inducidas por las células genéticamente modificadas objeto, que se describen bien en la técnica; por ejemplo, Coligan *et al.* Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons Inc. (1994).
- 55

La expresión “prevenir un tumor” usada en el presente documento significa que la aparición del tumor se previene o el inicio del tumor se retrasa significativamente. La expresión “tratar un tumor” usada en el presente documento significa que el crecimiento tumoral se inhibe significativamente, lo que se refleja mediante, por ejemplo, el volumen tumoral. El volumen tumoral puede determinarse mediante diversos procedimientos conocidos, por ejemplo, obteniendo mediciones bidimensionales con un calibre de esfera.

Cuando se indica “una cantidad inmunológicamente eficaz”, “una cantidad antitumoral eficaz” o “una cantidad que inhibe el tumor eficaz”, la cantidad precisa de las células genéticamente modificadas que va a administrarse puede determinarse por un médico considerando diferencias individuales en edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y estado del paciente. Puede establecerse generalmente que una composición terapéutica que comprende las células genéticamente modificadas del sujeto se administra convenientemente en una cantidad de al menos aproximadamente $1 \text{ por } 10^3$ hasta aproximadamente $5 \text{ por } 10^9$ células por dosis.

La administración de las composiciones terapéuticas objeto puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo mediante inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Convenientemente, las células genéticamente modificadas de la presente invención se administran a un paciente mediante inyección subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.), intraarterial (i.a.) o intravenosa (i.v.). El portador terapéuticamente aceptable debe esterilizarse mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

La invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo específico que no pretende de ningún modo limitar el alcance de la invención. Se prevé sustituir TGF β 1 y TGF β 3 por TGF β 2 en el siguiente ejemplo. Adicionalmente, se prevé sustituir células de SCLC por células de NSCLC en el siguiente ejemplo.

Ejemplo

Se usaron en un ensayo clínico cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas humanas que se han establecido previamente en el laboratorio de cultivo tisular. Se modificaron genéticamente estas células tumorales en el laboratorio para bloquear su secreción de TGF β . Entonces se usaron las células modificadas mediante ingeniería genética como vacunas en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas. Se inyectaron a los pacientes cuatro veces, en intervalos mensuales, los cócteles de vacunas genéticamente modificadas que constituyen las cuatro células tumorales modificadas con gen antisentido de TGF β no propias (alógenicas). El fundamento para usar células tumorales de otras personas es que se ha mostrado que las líneas celulares de tumor de pulmón que pertenecen a diferentes personas comparten características comunes que se reconocen por sistemas inmunitarios no propios. Se evaluaron los pacientes tratados cuatro meses tras entrar en la terapia. Los pacientes que responden a la terapia reciben de cuatro a doce inyecciones adicionales para evaluar si su respuesta a la terapia puede ampliarse.

Se asignan los pacientes aleatoriamente a una de las tres cohortes separadas. El cóctel de vacuna constituye un número igual de cada una de las cuatro líneas celulares de NSCLC modificadas con gen antisentido de TGF β irradiadas. El número de células inyectadas en las tres cohortes es de $1,25 \times 10^7$, $2,5 \times 10^7$ y 5×10^7 células respectivamente.

Se monitorizan la respuesta, el tiempo hasta la progresión tumoral y la supervivencia libre de tumor en pacientes y se comparan con controles históricos y pacientes que reciben otras formas de terapia. Se monitorizan los pacientes y se evalúan según criterios de evaluación convencionales de falta de respuesta, enfermedad estable, respuesta parcial y respuesta completa. Se usan los resultados de este estudio para evaluar la viabilidad del ensayo clínico adicional con células tumorales modificadas con gen antisentido del TGF β solo y en combinación con modificación con gen de IL-2 (u otra citocina).

Objetivo primario

El objetivo primario del ensayo clínico es evaluar la capacidad de dosis crecientes de una vacuna de células tumorales genéticamente modificadas para inducir respuesta tumoral en pacientes con NSCLC.

Diseño del estudio

Este estudio se diseña para evaluar la eficacia de la inmunización con dosis crecientes de una vacuna de células tumorales alógenicas en pacientes con NSCLC. Se hace un seguimiento a los pacientes para determinar la respuesta clínica, inmunogenicidad y seguridad.

Pacientes elegibles reciben 4 inyecciones intradérmicas mensuales con un cóctel celular compuesto por números iguales de cuatro líneas celulares de NSCLC modificadas con gen antisentido de TGF β 2 alógenicas irradiadas. Se asignaron aleatoriamente los pacientes a una de las tres cohortes de estudio. Los pacientes recibieron $1,25 \times 10^7$, $2,5 \times 10^7$, o 5×10^7 células genéticamente modificadas, respectivamente.

Cuando están disponibles, se usan muestras tumorales obtenidas de los pacientes de estudio en el momento de la cirugía clínicamente indicada para establecer una línea celular para cada paciente. Entonces se usan las células

tumorales de los pacientes en análisis de precursores o ensayo de citotoxicidad que monitorizan las respuestas inmunitarias de los pacientes a las inoculaciones de terapia génica.

Administración de las vacunas

5 Los pacientes reciben inyecciones intradérmicas de la vacuna de células tumorales en los meses 0, 1, 2, 3 y 4. Éstas se administran de forma ambulatoria. Se rotan los sitios de inyección entre las extremidades inferiores y superiores. Se observan los pacientes en la clínica durante 2 horas tras la vacunación. Durante este periodo de observación, se toman los signos vitales cada 30 minutos. Se da de alta a los pacientes que no experimentan efectos secundarios significativos del tratamiento 2 horas tras la vacunación.

Resumen de los procedimientos de estudio

10 Se vacunan los pacientes según el programa explicado brevemente en la tabla a continuación. Se tratan inicialmente los pacientes una vez al mes durante 4 meses, a menos que se documente toxicidad no manejable o progresión de la enfermedad clínicamente significativa que requiera intervención con otras terapias anticancerígenas. Se realiza la estadificación tumoral (mediante exploraciones de TAC/IRM completas) en el nivel inicial y en las semanas 8, 16 y 28 y cada 3 meses después de eso. Los pacientes tienen una monitorización en serie de la respuesta inmunitaria (repuestas de células T y humorales) cada 4 semanas hasta la semana 28 y cada 12 semanas después de eso. Se monitorizan los pacientes estrechamente para determinar la toxicidad durante todo el estudio. En los pacientes que demostraban beneficios del tratamiento, se proporcionan vacunaciones adicionales, administradas cada 4-8 semanas, durante hasta 12 vacunaciones adicionales (total de 16 vacunaciones).

Normas de detención

20 Dado que las respuestas tumorales frente a la vacunación pueden seguir un periodo de progresión tumoral inicial, se permite que los pacientes permanezcan en el estudio en medio de progresión clínicamente no significativa en la semana 8. En la semana 16, tales pacientes no deben mostrar progresión tumoral adicional (no más de un aumento del 25% en la semana 16 en comparación con la semana 8). Se retiran del estudio los pacientes que demuestran enfermedad progresiva en la semana 16 (en comparación con la semana 8).

25 Descripción del esquema de tratamiento mensual

Procedimiento	Selección	Día 1	Día 2	Día 8	Día 29/1
Consentimiento informado	X				
Historia, examen ¹	X [2]				X
Contacto telefónico			X		
Signos vitales, peso, PS	X [2]	X		X	X
Acontecimientos adversos	X [2]	X		X	X
Medicaciones concomitantes	X [2]	X		X	X
CBC con diferencial	X [1]	X		X	X
Panel de electrolitos	X [1]	X			X
Panel de metabolismo	X [2]	X			X
Estadificación tumoral ²	X [4]				
Biopsia del sitio de inoculación				X	
Inmunidad humoral ³	X [2]				X
Inmunidad celular ³	X [2]				X
Administración de la vacuna ⁴		X			X

[X]: en el plazo de X semanas antes del día 1

¹una vez al mes durante el tratamiento y una vez cada 3 meses en el seguimiento

²repetido en las semanas 8, 16, 28, luego cada 12 semanas

30 ³repetido en las semanas 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, luego cada 12 semanas

⁴administrado en las semanas 1, 4, 8, 12. Posible administración continuada para pacientes que responden

Definición de procedimientos

Teléfono de contacto:

La enfermera del estudio contacta telefónicamente con los pacientes para evaluar el grado de inflamación, dolor o puritis en el sitio de inyección local

CBC con diferencial:	WBC, HCT, HGB, recuento de plaquetas, % de neutrófilos, % de linfocitos, % de monocitos
Panel de electrolitos:	Sodio, potasio, cloruro, dióxido de carbono, BUN, creatinina, glucosa
Panel de metabolismo:	Calcio, fósforo, AST, ALT, fosfatasa alcalina, bilirrubina, ácido úrico, albúmina, proteína,
Estadificación tumoral:	Examen físico, rayos x, TAC/IRM según sea apropiado. Todas las evaluaciones deben usar el mismo método para evaluar el tumor tal como se usa en el nivel inicial
Biopsia del sitio de inoculación:	Biopsia tisular con sacabocados realizada en la periferia del sitio de vacunación inflamado o, si no hay inflamación, para incluir el sitio de vacunación
Inmunidad humoral:	Títulos antitumorales séricos
Inmunidad celular:	Inmunofenotipado de subconjuntos de células B y células T de sangre periférica (si están disponibles suficientes células) incluyendo CD3, CD4, CD8, CD16, CD20 y CD68. Medida del perfil de citocinas de PBC mediante cuantitativa (semi-cuantitativa), actividad NK (destrucción no específica), actividad LAK (alodestrucción).

Criterios de inclusión

- Consentimiento informado firmado
- ≥ 18 años
- 5 • NSCLC no curable histológicamente confirmado con enfermedad medible y un volumen estimado de 125 cc
- Estado de desempeño (ECOG) ≤ 2
- Recuento total de granulocitos 1.500/mm³
- Recuento de plaquetas 100.000/mm³
- Bilirrubina total ≤ 2 mg/dl
- 10 • AST y ALT $\leq 2x$ el límite superior de lo normal
- Creatinina $\leq 1,5$ mg/dl

Criterios de exclusión

- Esteroides sistémicos concurrentes > 20 mg de prednisona/día
- Esplenectomía anterior
- 15 • Cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia con esteroides o inmunoterapia < 4 semanas de ingreso en el estudio
- Metástasis cerebral o linfomatosis meníngea a menos que se trate y permanezca estable durante 2 meses
- Positivos para VIH conocidos
- 20 • Enfermedad no maligna grave (por ejemplo, insuficiencia cardiaca congestiva, o infecciones bacterianas, virales, o fúngicas no controladas activas), u otras condiciones que, en opinión del investigador, comprometerían los objetivos del protocolo.
- Tumores malignos anteriores (excluyendo carcinomas de la piel distintos de melanoma) a menos que esté en remisión durante ≥ 2 años
- Tratamiento con un fármaco en investigación en el plazo de los 30 días antes del ingreso en el estudio
- Historia de trastorno psiquiátrico que impediría la adherencia al protocolo
- 25 • Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia o que rechazan llevar a cabo anticoncepción si tienen posibilidad de reproducción

Realización del estudio

Se realiza el estudio según las buenas prácticas clínicas, la declaración de Helsinki y la ley US 21 CFR Parte 50 -

5 Protección de sujetos humanos, y Parte 56 - Comités de revisión institucionales. Se obtiene el consentimiento informado por escrito, con fecha para el estudio de todos los pacientes antes de llevarse a cabo los procedimientos especificados en los protocolos. Después de firmar, se facilita a los pacientes una copia de su consentimiento informado. Se obtiene la aprobación de este estudio por parte del Comité de revisión institucional apropiado antes de incluir a los pacientes en el estudio. Los documentos de consentimiento están en un lenguaje totalmente comprensible para los futuros pacientes. Se documenta el consentimiento o bien mediante la firma con fecha del paciente o bien mediante la firma de un testigo independiente que registra el consentimiento del paciente.

Respuesta tumoral

10 Se evalúan los pacientes mediante TAC/IRM y examen físico. Se notifica la respuesta usando medidas de desenlace convencionales para ensayos clínicos (respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP), enfermedad estable (EE) y enfermedad progresiva (EP)). Cualquier respuesta al tratamiento (o bien RP o bien RC) requiere dos evaluaciones de confirmación separadas al menos 4 semanas.

Respuesta completa

- Resolución de todas las enfermedades medibles durante un periodo de al menos 4 semanas
- 15 • Resolución de todas las enfermedades evaluables durante un periodo de al menos 4 semanas
- Sin lesiones nuevas (o bien medibles o bien evaluables)

Respuesta parcial

- Disminución en la suma del producto de todas las lesiones medibles mediante al menos el 50% durante un periodo de al menos 4 semanas
- 20 • Mejora subjetiva en enfermedad evaluable durante un periodo de al menos 4 semanas
- Sin lesiones nuevas (o bien medibles o bien evaluables)

Enfermedad estable

- Menos de un 50% de disminución Y menos de un 25% de aumento en la suma de los productos de todas las lesiones medibles
- 25 • Sin lesiones nuevas (o bien medibles o bien evaluables)

Enfermedad progresiva

- Más de un 25% de aumento en la suma de los productos de todas las lesiones medibles O lesiones nuevas (o bien medibles o bien evaluables)

Evaluación de la respuesta inmunitaria

30 Evaluación de la respuesta inmunitaria humoral

35 Se evalúan las respuestas inmunitarias antitumorales humorales comparando el título de los sueros antes del tratamiento y tras el tratamiento para determinar la reactividad contra las líneas celulares de vacunación usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). En resumen, se inmovilizan 10^5 células diana sobre discos de papel filtro en una cámara incubadora de 96 pocillos (V and P Enterprises, La Jolla, CA) y entonces se incuban durante 30 minutos con los sueros de prueba. Se lavan las placas y se incuban entonces con un anticuerpo anti-Ig humana conjugado con enzima. Se lavan nuevamente las placas, se añade el sustrato de la enzima y se cuantifica la unión midiendo la absorbancia de cada pocillo sobre un lector de ELISA.

Evaluación de la respuesta inmunitaria celular

Inmunofenotipado

40 Se realizan ensayos de citometría de flujo de inmunofluorescencia convencionales para evaluar los perfiles de células efectoras inmunitarias antes y tras el tratamiento de los pacientes. Se miden los porcentajes de subpoblaciones de células efectoras que reaccionan con anticuerpos monoclonales frente a células T (CD3, CD4, CD8), células citotóxicas naturales (CD16) y células B (CD20) en la población de linfocitos de sangre periférica antes y tras el tratamiento y se correlacionan con las respuestas de los pacientes medidas mediante otros criterios. En
45 resumen, se incuban las células mononucleares purificadas con Ficoll-Hypaque con el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavan y entonces se incuban con anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo. Se lavan las células, se fijan y se determina el porcentaje de células positivas con un citómetro de flujo. Las incubaciones de las células con anticuerpo de control de isotipo coincidente en lugar del anticuerpo primario

sirven como controles negativos.

Actividad citotóxica natural (NK)

5 Se analiza la actividad NK usando un ensayo de liberación de cromo convencional usando la línea celular sensible a NK K562 como diana. En resumen, se marcan las células K562 incubándolas con ⁵¹Cr durante 45 minutos a 37°C. Se lavan las células diana exhaustivamente y entonces se incuban 5 x 10³ K562 durante 4 horas a 37°C con PBMC antes y tras el tratamiento a razones de células efectoras:células diana que oscilan entre 100:1 y 3:1. Entonces se centrifugan las células y se mide la cantidad de liberación de ⁵¹Cr usando un contador gamma. Se determina el porcentaje de lisis específica usando la fórmula: (cpm experimental - cpm de fondo)/(cpm total - cpm de fondo) x 100.

10 Actividad LAK

Se determina la actividad LAK mediante un ensayo de liberación de cromo tal como se describió anteriormente, usando la línea celular sensible a LAK DAUDI como la diana.

Perfil de citocinas antes y tras el tratamiento de linfocitos

15 Se determina el perfil de citocinas de PBMC de los pacientes mediante ensayos de PCR semicuantitativa. Se extrae ARN de células mononucleares purificadas antes y tras el tratamiento de los pacientes y se usan para sintetizar ADNc de la primera cadena mediante un kit de ciclo de ADNc de Invitrogen (San Diego, CA) según la recomendación del fabricante. Entonces se usa el ADNc de la primera cadena como molde en ensayos de PCR que emplean diferentes conjuntos de cebadores para la detección de IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, GM-CSF, INF- γ , TNF- α , etc. Para lograr la cuantificación, se limitan las reacciones de PCR a 15-18 ciclos. Como control interno y para
20 ayudar a la cuantificación de los productos, se añaden concentraciones conocidas de un ARN de control a cada muestra antes de la iniciación de la síntesis de ADNc. Entonces se añaden cebadores específicos para la secuencia de control a las reacciones de PCR. Se determinan los perfiles de citocinas de muestras de los pacientes cuantificando productos de PCR de los pacientes y comparándolos con los productos de PCR de control.

Biopsia cutánea del sitio de inmunización

25 Se emplean métodos inmunohistoquímicos y de tinción con eosina y hematoxilina convencionales empleando anticuerpos monoclonales frente a subconjuntos de células hematopoyéticas para caracterizar los infiltrados inmunitarios observados en biopsias cutáneas en los sitios de inmunización. Se utilizan anticuerpos monoclonales frente a células T (CD3, CD4, CD8), células citotóxicas naturales (CD16) y células B (CD20) para estos estudios. En resumen, para los estudios inmunohistoquímicos, se fijan secciones de criostato en acetona fría y luego se incuban
30 con anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavan las secciones y entonces se incuban con anticuerpo secundario conjugado con peróxidasa del rábano seguido por tinción de las secciones con un sustrato cromógeno apropiado y se examinan mediante microscopía óptica. Las incubaciones de secciones con anticuerpo de control de isotipo coincidente en lugar del anticuerpo primario sirven como controles negativos.

Información del fármaco

35 Formulación clínica

Se proporciona la vacuna en viales congelados que contienen al menos 20 x 10⁶ células por vial.

Instrucciones para los farmacéuticos

Material no diluido

Volumen del vial:	1 ml
Aspecto:	Fluido turbio
Almacenamiento:	-176°C (nitrógeno líquido).
Riesgos:	Los viales congelados no se consideran peligrosos si no están rotos. Los viales contienen células congeladas en una mezcla que contiene dimetilsulfóxido al 10% y suero bovino fetal al 50%.
Manipulación:	Los viales congelados no se consideran un riesgo de seguridad si no están rotos. Los viales rotos deben desecharse según los procedimientos de riesgo biológico para fármacos citotóxicos.

Material diluido

Preparación:	Antes de inyectarse en los pacientes, se descongela un vial congelado en una cabina de bioseguridad y se lava dos veces con medio que contiene suero y cuatro veces con disolución de Ringer con lactato. Entonces se cuentan las células y se ajustan al número de células
--------------	---

Concentrado de fármaco:	apropiado por inyección en un volumen de 250-400 μ l. Se administra la suspensión celular en una jeringa de 1 ml tapada.
Diluyente:	1,25 x 10 ⁷ , 2,5 x 10 ⁷ o 5 x 10 ⁷ células por inyección en un volumen de 250-400 μ l.
Vía de administración:	Disolución de Ringer con lactato Inyección intradérmica

Almacenamiento

Se almacenan los viales no abiertos, congelados a -176°C (nitrógeno líquido).

Evaluación de los datos

5 Estadística y tamaño de muestra estimado

Se incluyen pacientes en la cantidad de 27-75. Este es un estudio de dos fases. Cada uno de las tres ramas de tratamiento incluye inicialmente 9 pacientes. Si no se observan respuestas en los primeros 9 pacientes, entonces no se incluyen pacientes adicionales en esa rama de tratamiento. Si se observa al menos 1 respuesta en los primeros 9 pacientes, entonces se incluyen 16 pacientes adicionales en esa rama de tratamiento para un total de 25 pacientes por rama de tratamiento.

10

Definición de pacientes evaluables

Se consideran pacientes evaluables para la respuesta tumoral si han completado al menos 2 vacunaciones y se han sometido a la reestadificación del tumor en la semana 8.

15

Se consideran pacientes evaluables para la respuesta inmunitaria si han tenido al menos 1 vacunación y han tenido análisis inmunitario en la semana 4.

Los pacientes son elegibles para determinar la toxicidad tras una única vacunación.

Notificación de los desenlaces

20

Se notifican las tasas de respuesta usando estadística descriptiva y tasas de notificación de RC, RP, EE y EP en los pacientes que se determinó que eran evaluables. Se determina el tiempo hasta la progresión tras la terapia inicial para los pacientes que experimentan o bien una RC o bien una RP.

Los criterios de evaluación secundarios incluyen respuesta inmunitaria, duración de respuesta y seguridad. También se notifican estas tasas usando estadística descriptiva. Se notifica la seguridad como el porcentaje de pacientes que experimenten un acontecimiento adverso dado. Se notifica el tiempo medio hasta la progresión para la población que responde usando estadística de Kaplan-Meier.

25

Líneas celulares de NSCLC no modificadas

30

Siete de las ocho líneas de NSCLC usadas en la producción de esta vacuna son líneas celulares establecidas que se adquieren de la American Tissue Cell Culture (ATCC). Se estableció la línea celular de NSCLC escamoso humano, Rh-2 a partir de una muestra de resección quirúrgica en el laboratorio del Dr. Steven Dubinett en UCLA en 1994, y está disponible al público por Lee *et al.*, J. Immunology 152: 3222, 1994; Huang *et al.*, Cancer Research 55: 3847, 1995; Huang *et al.*, J. Immunology 157: 5512, 1996; y Huang *et al.*, Cancer Research 58: 1208, 1998.

Plásmido antisentido pCHEK/HBA2:TGF β 2

35

Se derivó el vector pCHEK usado para construir el plásmido que contiene antisentido de TGF β 2 humano a partir del vector pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA). Se ha modificado ligeramente para facilitar la subclonación genética. El vector portador resultante es pCHEK. Se usó la subclonación genética para insertar el fragmento de gen antisentido de TGF β 2 (HBA2) en pCHEK. Se examinaron alícuotas del plásmido pCHEK/HBA2 mediante análisis con enzimas de restricción para garantizar 1) la identidad del vector portador en el que se clonó el antisentido de TGF β 2 y 2) la orientación correcta del inserto antisentido de TGF β 2.

40

Límites de la prueba: Homología completa con tamaños de fragmentos de ADN esperados tras una serie de digestos de restricción con 14 endonucleasas: Apal, BamHI, BglII, ClaI, EcoRV, HindIII, HpaI, NotI, NruI, PstI, Sall, SacI, Scal y XbaI.

Resultados: Los fragmentos de ADN observados obtenidos mediante estos digestos de restricción se correspondían con los tamaños de fragmento esperados del plásmido pCHEK/HBA2. En conclusión, el vector usado para la subclonación es correcto y el inserto de fragmento de gen antisentido de TGF β 2 está en la orientación correcta.

Los fragmentos esperados de estos digestos de restricción son:

Apal	4604 pb	3309 pb	1957 pb	874 pb	219 pb
BamHI	10963 pb				
BglII	10210 pb		753 pb		
Clal	10963 pb				
EcoRV	10963 pb				
HindIII	7540 pb	2787 pb	636 pb		
Hpal	10251 pb		712 pb		
NotI	10963 pb				
NruI	5716 pb	5247 pb			
PstI	7573 pb	1494 pb	1277 pb	619 pb	
Sall	8738 pb	2225 pb			
SacII	5347 pb	3340 pb	2276 pb		
Scal	8021 pb	1915 pb	1027 pb		
XbaI	9579 pb	1384 pb			

Inserto antisentido de TGFβ2

5 Para garantizar adicionalmente la secuencia y orientación correctas del fragmento antisentido de TGFβ2, se sometió a prueba el inserto mediante análisis de secuencia usando un analizador genético ABI-310 (Perkin Elmer, Foster City, CA).

Límites de la prueba: Homología completa entre el inserto del plásmido y el antisentido de TGFβ2.

10 Resultados: Los resultados de secuenciación obtenidos confirmaron la presencia del fragmento de TGFβ2 humano en el vector pCHEK. Estos resultados también confirmaron la orientación correcta del inserto. La secuencia del fragmento de TGF 2 humano usado en la construcción del vector pCHEK/HBA2 y sus regiones flanqueantes en el vector son tal como sigue. Las letras en minúscula representan las dos secuencias del vector que flanquean el fragmento de TGFβ2 humano.

tgtctggatc cggccttgcc ggcctcga (seq id no:2)-- secuencia del vector que flanquea el inserto--

15 par de bases 5 de TGFβ2 humano
 AATTC AAGCAGGATACGTTTTCTGTTGGGCATTGACTAGATTGTTTGCAAAGTTTCGCATCAAAAACAACAACA
 ACAAACAACAACAACCTCCTTGATCTATACTTTGAGAATTGTTGATTTCTTTTTTTTATTCTGACTTTTTAAAAACAAC
 TTTTTTTTCCACTTTTTTAAAAAATGCACTACTGTGTGCTGAGCGCTTTTCTGATCCTGCATCTGGTCACGGTCGC
 GCTCAGCCTGTCTACCTGCAGCACACTCGATATGGACCAGTTCATGCGCAAGAGGATCGAGGCGATCCGCGGG
 20 CAGATCCTGAGCAAGCTGAAGCTCACCAGTCCCCAGAAGACTATCCTGAGCCCGAGGAAGTCCCCCGGAGG
 TGATTTCCATCTACAACAGCACCAGGGACTTGCTCCAGGAGAAGGCGAGCCGGAGGGCGGCCGCCTGCGAGC
 GCGAGAGGAGCGACGAAGAGTACTACGCCAAGGAGGTTTACAAAATAGACATGCCGCCCTTCTTCCCCTCCGAA
 ACTGTCTGCCAGTTGTTACAACACCCTCTGGCTCAGTGGGCAGCTTGTGCTCCAGACAGTCCCAGGTGCTCTG
 TGGGTACCTTGATGCCATCCCAGCCACTTTCTACAGACCCACTTCCAGATTGTTCCGATTTGACGTCTCAGCAAT
 GGAGAAGAATGCTTCCAATTTGGTGAAAGCAGAGTTCAGAGTCTTTTCGTTTGAGAACCCTAAAAAGCCAGAGTGC
 25 CTGAACAACGGATTGAGCTATATCAGATTCTCAAGTCCAAAGATTTAACATCTCCAACCCAGCGCTACATCGACA
 GCAAAGTTGTGAAAACAAGAGCAGAAGGCGAATGGCTCTCCTTCGATGTAAGTACTGATGCTGTTTCATGAATGGCTTC
 ACCATAAAGACAGGAACCTGGGATTTAAAATA (SEQ ID NO: 1) -- par de bases 935 de TGFβ2 humano. -- agcttgct
 agcagctggt acccagct (seq id no: 3)-- secuencia del vector que flanquea el inserto

Líneas celulares de NSCLC genéticamente modificadas

30 Tras la transfección, se sometieron a prueba clones de cada línea celular genéticamente modificada para determinar la presencia del vector pCHEK/HBA2 mediante PCR. Sólo los clones con pruebas positivas para pCHEK/HBA2 se eligieron para análisis adicional.

Resultados: Colonias de siete de las ocho líneas celulares sometidas a prueba eran positivas para la transfección de antisentido de TGFβ2. La línea celular NCI-H-292 era negativa.

35 Regulación por disminución del TGFβ2

40 Tras la transfección, se sometieron a prueba clones de cada línea celular genéticamente modificada para detectar la regulación por disminución de TGFβ2 mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y se compararon con líneas celulares originales no modificadas. En resumen, se recogió supernadante libre de suero de cultivos de células modificadas con gen antisentido de TGFβ2 tras 24 h y se sometió a ensayo por triplicado para determinar los niveles de secreción de TGFβ2 empleando un kit de ELISA (Genzyme, Cambridge, MASS). Se capturó el TGFβ2 humano mediante un anticuerpo monoclonal anti-TGFβ2 humano y se cuantificó mediante

5 reacción con antisuero anti-TGF β 2 humano de cabra conjugado con peróxidasa del rábano según la recomendación del fabricante. Se logró la cuantificación revelando la reacción enzimática con un sustrato cromógeno y leyendo la densidad óptica en un lector de placas micro-ELISA. Una curva de TGF β 2 patrón que presenta concentraciones conocidas de TGF β 2 permitió la cuantificación de la secreción de TGF β 2 por las antisentido células modificadas con gen antisentido de TGF β 2.

Límites de la prueba para células tumorales no modificadas: Secreción de al menos 200 pg de TGF β 2/10⁶ células/24 h.

10 Límites de la prueba para líneas celulares de tumor genéticamente modificadas para vacuna: Disminución de la producción de TGF β 2 en al menos el 35% con respecto a células originales no modificadas. Se ha demostrado que este límite de la prueba potencia la inmunogenicidad de células tumorales en regímenes de vacunación, por Lee *et al.*, J. Immunology 152: 3222, 1994.

Aproximadamente 3-4 días antes del inicio de la terapia, vuelven a someterse a prueba alícuotas de cada línea celular genéticamente modificada para determinar la inhibición de TGF β 2. Se aplican los mismos límites de la prueba.

Línea celular	Carcinoma de pulmón	Niveles de TGFβ2 no modificados (ng/10⁶ células/24 h)	Niveles de TGFβ2 genéticamente modificado (ng/10⁶ células/24 h)	% de regulación por disminución de TGFβ2
NCI-H-292	Mucoepidermoide	ND	ND	ND
NCI-H-460	Célula grande	0,67	0,12	82%
NCI-520	Escamoso	2,27	1,43	37%
I-H-596	Adenoescamoso	1,5	2,6	-73%
NCI-H-661	Célula grande	13,1	12,96	1%
SK-LU-1	Adenocarcinoma	3,58	1,36	62%
SK-MES-1	Escamoso	1,2	1,36	-13%
Rh-2	Escamoso	1,16	0,1	91%

15 Las 4 líneas celulares seleccionadas fueron: NCI-H-460, NCI-H-520, SK-LU-1 y Rh-2. En los ensayos, las modificaciones con gen antisentido de TGF β 2 dieron como resultado el 37-91% de bloqueo de la expresión de TGF β 2 intrínseca en células tumorales. La supresión de la expresión de TGF β 2 en estas células se ha mantenido estable durante un periodo de seis a nueve meses en cultivo.

20 Densidad celular

Antes de la vacunación de pacientes se evalúa la densidad celular para cada línea celular. Se cuenta una alícuota de cada línea celular que va a usarse usando un hemocitómetro para determinar la densidad celular. Se mezclan números iguales de cada línea celular genéticamente modificada para las tres dosis que van a investigarse en este estudio (1,25 x 10⁶, 2,5 x 10⁶ y 5 x 10⁶ de células totales respectivamente).

25 Viabilidad celular

30 Antes de la vacunación de pacientes también se evalúa también la viabilidad celular para cada línea celular. Se evalúa la viabilidad de las células empleadas para la inmunización mediante métodos de exclusión con azul tripano. El tinte azul tripano es una medida de la integridad de la membrana plasmática. Las células viables mantienen la integridad de la membrana plasmática y por tanto excluyen el tinte. Las células muertas pierden la integridad de la membrana y permiten la captación del tinte apareciendo por tanto azules. Se somete a prueba una alícuota de cada línea celular y se cuentan las células en un hemocitómetro. Se determina el porcentaje de células "no azules" viables.

Límites de la prueba: La viabilidad de las células tumorales modificadas con gen antisentido de TGF β 2 usadas para la terapia debe ser superior al 50%.

35 Clonogenicidad

40 Para garantizar la seguridad, todas las líneas celulares de tumor genéticamente modificadas que van a usarse en las vacunaciones de pacientes deben irradiarse antes de la inyección. Esto es para impedir el crecimiento y replicación de las células tumorales. Se irradian las células antes de su uso con una dosis de 10.000 cGy. La selección de esta dosis de radiación se basa en conversaciones con el Dr. Herman Suit, jefe de Radiooncología en el Hospital General de Massachusetts. Está fue la dosis más baja de radiación suficiente para hacer que las células tumorales no

5 pudiesen proliferar y formar un tumor. Se desea utilizar la dosis de radiación más baja posible para las células transfectadas para optimizar el nivel y la duración de la transcripción de antisentido de TGFβ2. Además, se ha sometido a prueba esta dosis de irradiación en el laboratorio en células tumorales cultivadas de diferentes orígenes histológicos, incluyendo NSCLC humano, gliomas, cáncer de colon y líneas celulares de carcinoma pancreático y se ha demostrado que se puede detener completamente la formación de colonias por células tumorales cultivadas de diferentes orígenes histológicos.

10 Se irradiaron muestras de líneas celulares de NSCLC humano genéticamente modificadas y no modificadas con 10.000 centi-Grays. Entonces se cultivaron las células irradiadas en frascos T-225 y se observó la formación de colonias. Se definió una colonia como una agrupación de 16 células en crecimiento. Tal como se presenta en la tabla a continuación, no se formaron colonias en los cultivos irradiados durante un periodo de observación de cuatro-seis semanas. En cambio, todos los cultivos de control no irradiados se llegaron a la confluencia tras 10-14 días. Se produjo muerte celular aproximadamente dos semanas tras el inicio de los cultivos irradiados.

Efecto de la radiación sobre cultivos celulares de NSCLC primarios

Células tumorales	Dosis de radiación (Gys)	N.º de colonias a las 5 semanas
Cultivos de control	Ninguna	Confluentes tras 10-14 días
NCI-H-292	10.000	Ninguna
NCI-H-460	10.000	Ninguna
NCI-H-520	10.000	Ninguna
NCI-H-596	10.000	Ninguna
NCI-H-661	10.000	Ninguna
SK-Lu 1	10.000	Ninguna
SK-MES-1	10.000	Ninguna
Rh-2	10.000	Ninguna

15 Antes de la vacunación, se descongela una alícuota de cada línea celular genéticamente modificada y se somete a prueba para detectar la formación de colonias durante un periodo de cultivo de cuatro a seis semanas antes de que cada lote se considere seguro para su inyección en pacientes.

Límites de la prueba: Sin formación de colonias.

Esterilidad de las líneas celulares

20 Se realizaron pruebas de esterilidad para cada línea celular no modificada por la ATCC, el fabricante de las células.

Además, se enviaron alícuotas de cada línea a Molecular Diagnostics Associates para someter a ensayo la presencia de los siguientes agentes virales:

VIH 1 & 2	VHB	CMV
HH-6	VHC	VLTH
VEB	Virus adventicios	

25 Resultados: Se encontró que las ocho líneas celulares maestras no modificadas eran negativas para la presencia de bacterias, hongos y virus.

30 Durante el crecimiento y las manipulaciones *in vitro*, se sometió a prueba de manera rutinaria cada línea celular para detectar infección bacteriana, fúngica y por micoplasmas. Para evitar la contaminación con otras células, se procesaron los cultivos individualmente en todos los puntos durante manipulaciones en el laboratorio. Finalmente, en el día de terapia, vuelve a someterse a prueba una muestra del inóculo mediante una tinción de gram. Sólo las células que pasan todas las pruebas de esterilidad se usan para la terapia.

Los límites de la prueba son: Sin infecciones bacterianas, por micoplasmas o fúngicas.

Plásmido pCHEK/HBA2 de calidad clínica

35 Tras la caracterización preliminar del plásmido pCHEK/HBA2, se prepararon disoluciones madre de ADN a partir de cultivos bacterianos mediante el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly optimizado por Qiagen Corporation (Birnboim y Doly, 1979), y se purificaron sobre columnas de preparación EndoFree Giga de Qiagen. Se llevaron a

cabo todas las etapas en condiciones estériles usando puntas de barrera ART en la cabina de flujo de bioseguridad. Se retiró una alícuota del ADN de plásmido y se sometió a prueba para determinar la esterilidad. En resumen, se usaron 20 µl de ADN de plásmido para inocular cuatro tubos de cultivo que contenían cada uno 5 ml de LB libre de antibiótico. Se incubaron los cultivos durante cinco días a 37°C.

5 Límites de la prueba: Sin crecimiento de bacterias.

Resultados: No se observaron colonias, lo que la esterilidad del ADN de calidad clínica preparado.

Breve descripción general de los procedimientos de fabricación y envasado

10 Se adquirieron ocho líneas celulares de NSCLC establecidas de American Tissue Cell Culture (ATCC) u otro y se expandieron y se congelaron como bancos de células maestras no modificadas (unMCB). Se sometió a prueba cada línea para determinar la esterilidad (contaminantes bacterianos y virales), clonogenicidad y expresión de TGFβ2. Se descongelaron alícuotas de cada línea y se transfectaron con pCHEK/HBA2, un vector que contiene el trasgén antisentido de TGFβ2, usando técnicas convencionales. Se expandieron las líneas celulares genéticamente modificadas en cultivos, bajo selección con higromicina, para hacer crecer suficientes números para aplicaciones terapéuticas y pruebas. Entonces se sometieron a ensayo las líneas celulares expandidas para determinar la
15 regulación por disminución de la expresión de TGFβ2 y la esterilidad. Se identificaron cuatro líneas celulares de NSCLC que demostraron una regulación por disminución satisfactoria de la expresión de TGFβ2 y esterilidad: NCI-H-460, NCI-H-520, SK-LU-1 y Rh-2. Se congelaron estas líneas celulares en alícuotas como (1) bancos de células maestras genéticamente modificadas (gmMCB) y (2) bancos de células de trabajo genéticamente modificadas (gmWCB) y se almacenaron en nitrógeno líquido. Antes de su uso, se descongelan alícuotas de estas cuatro líneas
20 celulares del gmWCB, se irradian con 10.000 Gy y vuelven a someterse a prueba para determinar la esterilidad, clonogenicidad y regulación por disminución de TGFβ2. Sólo los lotes de células que pasan todos los límites de la prueba son aceptables para la preparación de la vacuna. En el día de inyección, se descongelan entonces suficientes células de cada uno de los lotes de gmWCB aceptables, se irradian y se mezclan en números iguales. Antes de la vacunación del paciente, se somete a prueba una muestra del inóculo para detectar contaminación
25 bacteriana. Si no se detecta contaminación, puede procederse a la vacunación.

Adquisición de tejidos

30 Se obtuvieron las siguientes ocho líneas celulares de NSCLC establecidas de American Type Culture Collection (ATCC) u otro, se expandieron en cultivo y se congelaron como bancos de células maestras no modificadas (8 unMCB totales). Se cultivaron las líneas celulares en IMDM complementado con FBS al 10%, Hepes 25 mM, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, fungizona 2,5 µg/ml, sulfato de gentamicina 50 µg/ml, α-tioglicerol 10⁻⁴ M y aminoácidos no esenciales. Se congeló cada línea celular como uno lote que contiene 100 viales a > 10⁸ células/vial. Se sometió a prueba cada línea para determinar la esterilidad y expresión de TGF 2. Se usaron las siguientes líneas celulares:

- NCI-H-292
- 35 • NCI-H-460
- NCI-H-520
- NCI-H-596
- NCI-H-661
- SK-LU-1
- 40 • SK-MES-1
- Rh-2

Construcción del plásmido de expresión de antisentido de TGFβ2 humano

Descripción del plásmido pCHEK/HBA2

45 Se derivó el vector pCHEK usado para construir el plásmido de expresión de antisentido de TGFβ2 humano (pCHEK/HBA2) del vector pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA) para facilitar la modificación genética de células cancerosas y para eliminar problemas de seguridad. El vector pCHEK es idéntico al vector pCEP4 en todas las regiones excepto por lo siguiente:

- Se incorpora resistencia a kanamicina, en lugar de resistencia a ampicilina, en el vector pCHEK.
- En el vector pCHEK, una unidad de casete de ADN que consiste del promotor temprano de SV-40 seguido por un

intrón dirige la expresión del gen de resistencia a higromicina. La incorporación de la unidad de promotor de SV-40/intrón es para aumentar la expresión del gen de resistencia a higromicina para facilitar la selección de células genéticamente modificadas en cultivo.

5 El plásmido pCHEK/HBA2 utiliza un promotor de CMV para dirigir la expresión de un fragmento de TGFβ2 humano de 930 pares de bases en orientación antisentido. El fragmento antisentido de TGFβ2 consiste en 6-935 bases del extremo 5' de la molécula de ADNc de TGFβ2 humano que se ligó en orientación inversa adyacente a y bajo el control del promotor de CMV. El vector pCHEK también contiene el gen de resistencia a higromicina dirigido por el promotor temprano de SV-40, el origen de replicación del virus de Epstein-Barr y el gen para la proteína 1 asociada al núcleo del virus de Epstein-Barr (EBNA-1). Adicionalmente, el vector contiene el origen de ColE1 y genes de resistencia a kanamicina para la selección de bacterias que contienen el vector durante la fabricación del ADN.

DOMINIOS DEL VECTOR pCHEK

<i>Dominio</i>	<i>Fragmento que contiene el dominio</i>
Señal de poli A de SV-40	1-405
Sitio de clonación múltiple	406-463
Promotor de CMV	467-1311
Señal de poli A de TK	1312-1843
Higromicina	1844-2899
Intrón	2900-3233
Promotor temprano de SV-40	3234-3602
Origen de ColE1 & resistencia a kanamicina	3603-5188
EBNA-1	5189-7789
Origen de replicación de Epstein Barr (OriP)	7790-1046

Subclonación del antisentido de TGFβ2 en el vector pCHEK

Aislamiento de TGFβ2

15 Para construir el plásmido pCHEK/HBA2, se construyó en primer lugar pCEP4/HBA2, un vector lanzadera. En resumen, se digirió el plásmido pPC21 (disponible al público por el Dr. Purchio) que contiene el gen de TGFβ2 humano hasta el final con EcoRI. Se hicieron romos los extremos de EcoRI ajustando las condiciones de reacción a 250 μM de cada dATP, dCTP, dGTP, y dTTP y añadiendo 3 unidades de enzima Klenow para iniciar la reacción. Se dejó que la reacción avanzara durante 30 minutos a 37°C. Entonces se ajustó el volumen de reacción a 100 μl con TE y se extrajo con fenol/cloroformo. Se precipitó el ADN con isopropanol y se enjuagó con etanol al 70%. Se liberó el fragmento de TGFβ2 de 930 pares de bases (HBA2) del vector mediante digestión con Hind III. Tras la electroforesis en un gel de agarosa al 1%, se cortó un trozo de gel que contenía el fragmento de TGFβ2 de 930 pb y se extrajo el fragmento de ADN mediante un método rutinario de sílice oxidada (polvo de vidrio). Entonces el ADN de TGFβ2 estaba listo para ligarse en el vector pCEP4.

25 Construcción del vector lanzadera pCEP4/HBA2

Se preparó el vector pCEP4 mediante digestión con la enzima de restricción XhoI, y se hicieron romos sus extremos mediante reacción con Klenow tal como se describió anteriormente. Tras la extracción con fenol/cloroformo y la precipitación con etanol, se digirió el vector con Hind III y se purificó mediante el método de electroforesis en gel de agarosa / polvo de vidrio tal como se describió anteriormente.

30 Se subclonó direccionalmente el fragmento de TGFβ2 humano de 930 pares de bases en el vector pCEP4 en orientación antisentido. Tras la transformación de *E. coli*, se preparó ADN de pCEP4/HBA2 a partir de varias colonias bacterianas transformadas resistentes a ampicilina. Se caracterizó el ADN aislado a partir de estas colonias mediante análisis con enzimas de restricción y se seleccionó un clon designado como pCEP4/HBA2 y se usó para la construcción del plásmido clínico pCHEK/HBA2.

35 Construcción del plásmido de la expresión pCHEK/HBA2

En resumen, se digirió el ADN de pCEP4/HBA2 con las enzimas de restricción Kpn I y Bam HI y se purificó el fragmento de inserto antisentido de TGF 2 de 930 pb mediante electroforesis en gel de agarosa. Entonces se ligó el inserto en el vector pCHEK digerido con Kpn I y Bam HI, y se usó para transformar bacterias. Tras la selección con kanamicina del cultivo durante la noche, se aisló el ADN de pCHEK/HBA2 a partir de varios clones y se caracterizó mediante análisis con enzimas de restricción para garantizar la identidad correcta. Para garantizar adicionalmente la secuencia y orientación correctas del fragmento antisentido de TGFβ2, se sometió a prueba el inserto mediante análisis de secuencia usando un analizador genético ABI-310 (Perkin Elmer, Foster City, CA).

Fabricación del plásmido pCHEK/HBA2 de calidad clínica

Tras la caracterización preliminar, se cultivó en línea una colonia bacteriana que contenía el plásmido pCHEK/HBA2 sobre una placa de agar Luria-Bertani (LB) que contenía kanamicina 100 µg/ml. Tras la incubación a 37°C, se usó una única colonia bacteriana para inocular 5 ml de caldo LB que contenía kanamicina 100 µg/ml y se hizo crecer durante la noche a 37°C en una incubadora bacteriana con agitación. Se usó este cultivo durante la noche para inocular 50 ml de cultivo de bacterias que contienen plásmido. Se incubó el cultivo bacteriano de 50 ml durante la noche y se usó para inocular frascos que contenían 2 litros de LB más kanamicina 100 µg/ml. Esto se hizo crecer durante la noche a 37°C.

Se preparó ADN a partir de los cultivos bacterianos mediante el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly optimizado por Qiagen Corporation (Birnboim y Doly, 1979), y se purificó en columnas de preparación EndoFree Giga de Qiagen. Se llevaron a cabo todas las etapas en condiciones estériles usando puntas de barrera ART en la cabina de flujo de bioseguridad.

Se retiró una alícuota de ADN para el análisis de restricción y la determinación de la concentración de ADN. Se ajustó la concentración de ADN de plásmido hasta un mg/ml, se dividió en alícuotas y se almacenó a -70°C para su uso futuro. Se retiró una alícuota de ADN de plásmido y se sometió a prueba para la determinación de la esterilidad.

Modificación genética de las líneas celulares NSCLC tumorales con el plásmido pCHEK/HBA2

Se retiraron cuatro alícuotas de cada línea celular de NSCLC del unMCB apropiado y se hicieron crecer en cultivo. Se alimentaron las células con medio nuevo dos veces por semana. En el día de la modificación genética se alimentaron las células con medio nuevo. Cuatro horas después se tripsinizaron las células, se lavaron con medio que contenía suero y posteriormente PBS. Se ajustó la densidad celular a $1-2 \times 10^7$ células por ml en un volumen de 350 µl de PBS y se incubaron en hielo durante 15-20 minutos. Se añadieron 50 µg del plásmido pCHEK/HBA2. Se incubó la mezcla en hielo durante otros 10-15 minutos. Entonces se transfirió la suspensión celular a una cubeta previamente enfriada y se incubó en hielo. Tras cinco minutos se colocaron las cubetas en un electroporador de onda cuadrada (Genetronics, San Diego, CA) y se sometieron a tres pulsos de electroporación de 3000 v/cm cada pulso durante 75 µsegundos. Se añadió 1 ml de medio nuevo frío que contenía Hepes 50 mM y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 minutos. Entonces se sembraron en placa las células durante 2 ciclos de división y entonces se comenzó la selección (72 horas tras la transfección). Se añadió medio nuevo que contenía 25 µg de higromicina/ml a los cultivos. Se expandieron las células genéticamente modificadas en cultivo y se congelaron como bancos de células maestras genéticamente modificadas (gmMCB) para un total de 4 gmMCB por línea celular. Se determinó la presencia del plásmido pCHEK/HBA2 en las células genéticamente modificadas mediante PCR. Además, se presentaron cinco viales (5%) de cada gmMCB y se usaron para pruebas de esterilidad que consisten en ensayos aeróbios, anaeróbios, de micoplasmas y fúngicos.

Preparación e identificación de líneas celulares para la vacunación de pacientes

Tras la modificación genética, se expandieron las líneas celulares tumorales en cultivo para hacer crecer suficientes células para pruebas y aplicaciones terapéuticas. Se crioconservaron clones de cada línea celular que pasaban los límites de las pruebas de identidad, concentración y seguridad en nitrógeno líquido como alícuotas de bancos de células maestras genéticamente modificadas (gmMCB) y bancos de células de trabajo genéticamente modificadas (gmWCB). Antes de la vacunación de pacientes, se descongelan alícuotas de cada lote de gmWCB y se irradian con una dosis de 10.000 cGy, una dosis de radiación que se ha demostrado que puede detener completamente la formación de colonias por células tumorales cultivadas de diferentes orígenes histológicos incluyendo estas células de NSCLC. Alícuotas de cada lote se someten a pruebas de seguridad, concentración e identidad para garantizar que no se ha producido alteración o contaminación durante las manipulaciones celulares y la congelación. Se someten a prueba los lotes para determinar: la clonogenicidad, esterilidad y regulación por disminución de TGFβ2.

Preparación celular y pruebas previas a la vacunación de pacientes

Antes de la inmunización subcutánea, se colocan alícuotas de las cuatro líneas celulares escogidas en cultivos a corto plazo. Se desprenden células genéticamente modificadas de los placas de cultivo, se lavan y se resuspenden en medio, se irradian con 10.000 cGy, se lavan y se resuspenden en disolución de Ringer con lactato. Entonces se someten a prueba para determinar la esterilidad y viabilidad. Sólo las células que pasan los límites de las pruebas se usan para la vacunación de pacientes.

50 **Bibliografía citada**

Ashley DM, Kong FM, Bigner DD, Hale LP. Endogenous expression of transforming growth factor β1 inhibits growth and tumorigenicity and enhances Fas-mediated apoptosis in a murine high-grade glioma model. Cancer Res 58 (2): 302-309, 1998.

55 Ashley DM, Sampson JH, Archer GE, Hale LP, Bigner DD. Local production of TGF β1 inhibits cerebral edema, enhances TNF-α induced apoptosis and improves survival in a murine glioma model. J Neuroimmunol 86(1): 46-52,

- 1998.
- Baker JC y Harland RM. From receptor to nucleus: the Smad pathway. *Curr. Opin. Gen. Devel.* 7: 467-473, 1997.
- 5 Bodmer S, Podlisny MB, Selkoe DJ, Heid I, y Fontana A. Transforming growth factor-beta bound to soluble derivatives of the beta amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 171: 890-897, 1990.
- Bodmer S, Strommer K, Frei K, Siepl C, de Tribolet N, Heid I, Fontana A. Immunosuppression and transforming growth factor- β in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor- β 2. *J Immunol* 143(10): 3222-3229, 1989.
- 10 Border, W.A., y Rouslahti E. Transforming growth factor- β in disease: the dark side of tissue repair. *J.Clin. Invest.* 90: 1, 1992.
- Chen TC, Hinton DR, Yong VW, Hofman FM. TGF- β 2 and soluble p55 TNFR modulate VCAM-1 expression in glioma cells and brain derived endothelial cells. *J Neuroimmunol* 73(1-2): 155-161, 1997.
- Constam DB, Phillip J, Malipiero UV, ten Dijke P, Schachner M, y Fontana A. Diferential expression of Transforming Growth Factor- β 1, - β 2, and - β 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J. Immunol.* 148: 1404-1410, 1992.
- 15 Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, y Blaese RM. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256: 1550-1552, 1992.
- Dorigo O, Shawler DL, Royston I, Sobol RE, y Fakhrai H. Synergy of Transforming Growth Factor beta (TGF- β) antisense and IL-2 gene therapy in the murine ovarian teratoma (MOT) model. *Gynecol Oncol* 71(2): 204-210, 1998.
- 20 Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, y Mulligan R. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 3539-3543, 1993.
- Dubinett SM; Miller PW; Sharma S; Batra RK Gene therapy for lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 12 (3): 569-94, 1998.
- 25 Eastham JA, Truong LD, Rogers E, Kattan M, Flanders KC, Scardino PT, Thompson TC. Transforming growth factor-beta 1: comparative immunohistochemical localization in human primary and metastatic prostate cancer. *Laboratory Investigation* 73(5): 628-635, 1995.
- Eder IE, Stenzl A, Hobisch A, Cronauer MV, Bartsch G, Klocker H. Transforming growth factors-beta 1 and beta 2 in serum and urine from patients with bladder carcinoma. *J. Urology* 156(3): 953-957, 1996.
- 30 Fakhrai H, Shawler DL, Gjerset R, Koziol J, Naviaux R, Royston I, y Sobol RE. Cytokine gene therapy with interleukin- 2 transduced fibroblasts: effects of IL-2 on anti-tumor immunity. *Human Gene Therapy* 6: 591-601, 1995.
- Fakhrai H, Dorigo O, Shawler DL, Lin H, Mercola D, Black KL, Royston I, y Sobol RE. Eradication of established intracranial rat glioma by Transforming Growth Factor beta antisense gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2909-2914, 1996.
- 35 Friedman E, Gold LI, Klimstra D, Zeng ZS, Winawer S, Cohen A. High levels of transforming growth factor beta 1 correlate with disease progression in human colon cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 4(5): 549-554, 1995.
- Heldin CH, Miyazono K, y Dijke P. TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471, 1997.
- 40 Hirte, H., y Clark D.A. Generation of lymphokine-activated killer cells in human ovarian carcinoma ascitic fluid: identification of Transforming Growth Factor-beta as a suppressive factor. *Cancer Immuno. Immunother.* 32: 296-302, 1991.
- Holladay FP, Heitz T, Chen YL, Chiga M, y Wood GW. Successful treatment of a malignant rat glioma with cytotoxic T lymphocytes. *Neurosurgery* 31: 528-533, 1992.
- 45 Holladay FP, Heitz T, y Wood GW. Antitumor activity against established intracerebral gliomas exhibited by cytotoxic T lymphocytes, but not by lymphokine-activated killer cells. *J. of Neurosurgery* 77: 757-762, 1992.
- Holladay FP, Lopez G, De M, Morantz RA, y Wood GW. Generation of cytotoxic immune responses against a rat glioma by in vivo priming and secondary in vitro stimulation with tumor cells. *Neurosurgery* 30: 499-504, 1992.

- Huber BE, Richards CA, y krenitsky TA. Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: An innovative approach for cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 8039-8043, 1991.
- 5 Jachimczak P, Bogdahn U, Schneider J, Behl C, Meixensberger J, Apfel R, Dorries R, Schlingensiepen KH, y Brysch W. The effect of Transforming Growth Factor- β 2-specific phosphorothioate-anti-sense oligodeoxynucleotides in reversing cellular immunosuppression in malignant glioma. *J. Neurosurg.* 78: 944-951, 1993.
- Jakowlew SB, Mathias A, Chung P, Moody TW. Expression of transforming growth factor beta ligand and receptor messenger RNAs in lung cancer cells lines. *Cell Growth and Differentiation* 6(4): 465-476, 1995.
- 10 Jennings MT, Hart CE, Commers PA, Whitlock JA, Martincic D, Maciunas RJ, Moots PL, Shehab TM. Transforming growth factor β as a potential tumor progression factor among hyperdiploid glioblastoma cultures: evidence for the role of platelet-derived growth factor. *J Neurooncol* 31(3): 233-254, 1997.
- Jennings MT, Kaariainen IT, Gold L, Maciunas RJ, Commers PA. TGF- β 1 y TGF- β 2 are potential growth regulators for medulloblastomas, primitive neuroectodermal tumors, and ependymomas: evidence in support of an autocrine hypothesis. *Hum Pathol* 25(5): 464-475, 1994.
- 15 Jennings MT, Pietenpol JA. The role of transforming growth factor β in glioma progression. *J Neurooncol* 36 (2): 123-140, 1998.
- Kasid A, Bell GI, y Director EP. Effects of transforming growth factor beta on human lymphokine activated killer cell precursors: Autocrine inhibition of cellular proliferation and differentiation to immune killer cells. *J. Immunol.* 141: 690, 1988.
- 20 Kim IY, Kim JH, Lang S, Kozlowski JM, Lee C. Successful treatment of established rat prostate cancer by transforming growth factor-1 antisense transfected tumor vaccine. *American Urological Association, Inc. Annual Meeting.* 1997.
- Kong FM, Anscher MS, Murase T, Abbott BD, Iglehart JD, Jirtle RL. Elevated plasma transforming growth factor-beta 1 levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. *Annals of Surgery* 222(2): 155-162, 1995.
- 25 Liau LM, Fakhrai H, Black KL. Prolonged survival of rats with intracranial C6 gliomas by treatment with TGF-beta antisense gene. *Neurol Res* 20(8): 742-747, 1998.
- Massague, J. The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell* 49: 437, 1987.
- Merzak A, McCrea S, Koocheckpour S, Pilkington GJ. Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor- β 1. *Br J Cancer* 70(2): 199-203, 1994.
- 30 Miller PW; Sharma S; Stolina M; Chen K; Zhu L; Paul RW; Dubinett SM. Dendritic cells augment granulocytemacrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)/herpes simplex virus thymidine kinase-mediated gene therapy of lung cancer. *Cancer Gene Ther.* 5(6):380-9, 1998
- Naganuma H, Sasaki A, Satoh E, Nagasaka M, Nakano S, Isoe S, Tasaka K, Nukui H. Transforming growth factor- β inhibits interferon-gamma secretion by lymphokine-activated killer cells stimulated with tumor cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 36(11): 789-795, 1996.
- 35 Nandan D, Reiner NE. TGF-beta attenuates the class II transactivator and reveals an accessory pathway of IFN-gamma action. *Journal of Immunology* 158(3): 1095-1101, 1997.
- Ram Z, Culver KW, Walbridge S, Blaese RM, y Oldfiel EH. In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of Brain tumors in rats. *Cancer Research* 53: 83-88, 1993.
- 40 Ramanathan RK; Belani CP. Chemotherapy for advanced non-small cells lung cancer: past, present, and future. *Semin Oncol.* 24(4):440-54, 1997
- Ransohoff J, Koslow M, y Cooper RP. *Cancer of the central nervous system and pituitary.* E: American Cancer Society Textbook of Clinical Oncology. Holleb AI, Fink DJ, y Murphy GP, editors, págs. 329-337, 1991.
- 45 Rook AM, Kerhl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Sporn MB, Burlington DB, Lane HC, y Fauci AS. Effects of Transforming growth factor-beta on the function of natural killer cells. Depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J Immunol.* 136 (10): 3916-3920, 1986.
- Roth JA; Swisher SG; Merritt JA; Lawrence DD; Kemp BL; Carrasco CH; El-Naggar AK; Fossella FV; Glisson BS; Hong WK; Khurl FR; Kurie JM; Nesbitt JC; Pisters K; Putnam JB; Schrupp DS; Shin DM; Walsh GL. Gene therapy for non-small cells lung cancer: a preliminary report of a phase I trial of adenoviral p53 gene replacement. *Semin*

- Oncol. 25(3 supl. 8):33-7, 1988.
- 5 Sobol RE; Shawler DL; Carson C; Van Beveren C; Mercola D; Fakhrai H; Garrett MA; Barone R; Goldfarb P; Bartholomew RM; Brostoff S; Carlo DJ; Royston I; Gold DP. Interleukin 2 gene therapy of colorectal carcinoma with autologous irradiated tumor cells and genetically engineered fibroblasts: a Phase I study. *Clin. Cancer Res.* 5(9):2359-65, 1999.
- Sporn M., Roberts, A.B., Wakefield L.M., y Asoian R.K. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science* 233: 532-534, 1986.
- 10 Stiles JD, Ostrow PT, Balos LL, Greenberg SJ, Plunkett R, Grand W, Heffner RR Jr. Correlation of endothelin- 1 and transforming growth factor- β 1 with malignancy and vascularity in human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56 (4): 435-439, 1997.
- Swisher SG; Roth JA; Nemunaitis J; Lawrence DD; Kemp BL; Carrasco CH; Connors DG; El-Naggar AK; Fossella F; Glisson BS; Hong WK; Khuri FR; Kurie JM; Lee JJ; Lee JS; Mack M; Merritt JA; Nguyen DM; Nesbitt JC; Perez-Soler R; Pisters KM; Putnam JB Jr; Richli WR; Savin M; Waugh MK; et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 5;91(9):763-71, 1999
- 15 Takenoyama M; Yasumoto K; Harada M; Sugimachi K; Nomoto K. Antitumor response of regional lymph node lymphocytes in human lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 47(4):213-20, 1998.
- Trojan J, Blossey BK, Johnson TR, Rudin EE, Tykocinski ML, Ilan J, y Ilan J. Loss of tumorigenicity of rat glioblastoma directed by episome-based antisense cDNA transcription of insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 4874-4878, 1992.
- 20 Trojan J, Johnson TR, Rudin EE, Ilan J, Tykocinski ML, y Ilan J. Treatment and prevention of rat glioblastoma by immunogenic C6 cells expressing antisense insulin-like growth factor I ARN. *Science* 259: 94-96, 1993.
- Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, y Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β . *Nature* 334:260, 1988.
- 25 Yamada N, Kato M, Yamashita H, Nister M, Miyazono K, Heldin CH, Funa K. Enhanced expression of transforming growth factor-beta and its type-I y type-II receptors in human glioblastoma. *International Journal de Cancer* 62(4): 386-392, 1995.
- Yingling JM, Datto MB, Wong C, Frederick JP, Liberati NT, y Wang XF. Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor β -inducible DNA binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 17 (12): 7019-7028, 1997.

Lista de secuencias

<110> Fakhrai, Habib

<120> Células genéticamente modificadas que expresan un inhibidor de TGF-beta, siendo las células células de cáncer de pulmón

<130> ADBIO.003PCT

5 <150> US 60/193.497

<151> 31-05-2000

<160> 3

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

10 <211> 927

<212> ADN

<213> Factor de crecimiento transformante beta-2 humano

<400> 1

```

aattcaagca ggatacgttt ttctgttggg cattgactag attgittgca aaagtttcgc 60
atcaaaaaca acaacaaca aacaacaac tctccttgat ctatactttg agaattgttg 120
atctcttttt tttattctga cttttaaaaa caactttttt ttccactttt ttaaaaaatg 180
cactactgtg tgctgagcgc ttttctgatc ctgcactctgg tcacggtcgc gctcagcctg 240
tctacctgca gcacactcga tatggaccag ttcattgcgca agaggatcga ggcgatccgc 300
ggcgagatcc tgagcaagct gaagctcacc agtccccccag aagactatcc tgagcccagag 360
gaagtcccc cggagggtgat ttccatctac aacagcacca gggacttgct ccaggagaag 420
gcgagccgga gggcggccgc ctgagagcgc gagaggagcg acgaagagta ctacgccaag 480
gaggtttaca aaatagacat gccgcccttc tccccctccg aaactgtctg cccagttggt 540
acaacacctt ctggctcagt gggcagcttg tgctccagac agtcccaggt gctctgtggg 600
taccttgatg ccatcccgcc cactttctac agaccctact tcagaattgt tcgatttgac 660
gtctcagcaa tggagaagaa tgcttccaat ttggtgaaag cagagttagc agtctttcgt 720
ttgcagaacc caaaagccag agtgcctgaa caacggattg agctatatca gattctcaag 780
tccaaagatt taacatctcc aaccagcgc tacatcgaca gcaaagttgt gaaaacaaga 840
gcagaaggcg aatggctctc cttcgatgta actgatgctg ttcatgaatg gcttcaccat 900
aaagacagga acctgggatt taaaata                                     927
    
```

15 <210> 2

<211> 28

<212> ADN

<213> Inserto de TGF-beta2 que flanquea la secuencia del vector

<400> 2

20 tgtctggatc cggccttgcc ggcctcga 28

<210> 3

<211> 26

<212> ADN

<213> Inserto de TGF-beta2 que flanquea la secuencia del vector

25 <400> 3

agcttgctag cagctgttac ccagct 26

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de células genéticamente modificadas que contienen una construcción genética que expresa un inhibidor de TGF β eficaz para reducir la expresión de TGF β , en la que dichas células genéticamente modificadas son células de cáncer de pulmón.
- 5 2. Composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de células genéticamente modificadas que contienen una construcción genética que expresa un inhibidor de TGF β eficaz para reducir la expresión de TGF β , en la que dichas células genéticamente modificadas son células de cáncer de pulmón, para su uso en la prolongación de la supervivencia de un sujeto que tiene cáncer de pulmón.
- 10 3. Uso de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de células genéticamente modificadas que contienen una construcción genética que expresa un inhibidor de TGF β eficaz para reducir la expresión de TGF β , en el que dichas células genéticamente modificadas son células de cáncer de pulmón para la preparación de un medicamento para prolongar la supervivencia de un sujeto que tiene cáncer de pulmón.
- 15 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, composición según la reivindicación 2 o uso según la reivindicación 3, en los que dichas células de cáncer de pulmón son células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) o células de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC).
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 ó 4, composición según la reivindicación 2 ó 4 o uso según la reivindicación 3 ó 4, en los que dicho TGF β es TGF β -1 o TGF β -2.
- 20 6. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 y 5, composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 y 5 o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en los que dichas células genéticamente modificadas son células autólogas, células alogénicas o mezclas de células autólogas y alogénicas.
- 25 7. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 6, composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 6 o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en los que dichas células genéticamente modificadas expresan además una o más citocinas que tienen efectos inmunoestimuladores.
- 30 8. Composición farmacéutica, composición o uso según la reivindicación 7, en los que dichas una o más citocinas se selecciona del grupo que consiste en interleucina 1, interleucina 2, interleucina 3, interleucina 4, interleucina 5, interleucina 6, interleucina 7, interleucina 8, interleucina 9, interleucina 10, interleucina 11, interleucina 12, interleucina 15, interferón alfa, interferón gamma, factor de necrosis tumoral alfa, factor de crecimiento transformante beta, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos y factor estimulante de colonias de granulocitos.
- 35 9. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 8, composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 8 o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en los que dicho inhibidor de TGF β es un antisentido, una ribozima, un mutante negativo dominante o un anticuerpo.
- 40 10. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 9, composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 9 o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en los que dicho inhibidor de TGF β es un antisentido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.
11. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 10, composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 10 o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en los que dicho inhibidor de TGF β impide la interacción entre la proteína Smad y el receptor de TGF β .
12. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 11, composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 11 o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, en los que dicha composición se proporciona en forma farmacéutica unitaria.