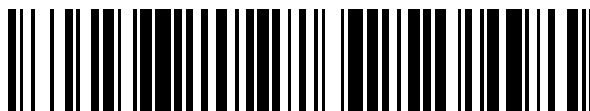


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 764**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

C12N 7/01 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.1998 E 06021697 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 1776957**

54 Título: **Uso de vectores de herpes para terapia tumoral**

30 Prioridad:

12.08.1997 US 55142 P

22.04.1998 US 64174

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.07.2017

73 Titular/es:

GEORGETOWN UNIVERSITY (100.0%)

37th & O Streets, N.W.

Washington, DC 20057, US

72 Inventor/es:

RABKIN, SAMUEL D.;

TODA, MASAHIRO y

MARTUZA, ROBERT L.

74 Agente/Representante:

SERRAT VIÑAS, Sara

ES 2 627 764 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de vectores de herpes para terapia tumoral

5 Antecedentes de la invención

La inducción de inmunidad específica de tumor es un enfoque atractivo para la terapia contra el cáncer debido a la posibilidad de aprovechamiento de los mecanismos de defensa propios del organismo, en vez de usar agentes terapéuticos tóxicos convencionales, para proporcionar protección a largo plazo frente a la existencia, el crecimiento y la reaparición de tumores. Esta estrategia es atractiva por su potencial para destruir tumores metastásicos pequeños que pueden escapar de la detección, y para proporcionar inmunidad frente a tumores recurrentes.

En principio, una inmunoterapia dependería de la presencia de antígenos específicos de tumor y de la capacidad para inducir una respuesta inmunitaria citotóxica que reconoce células tumorales que presentan antígenos. Los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) complejadas con péptidos derivados de proteínas celulares presentadas sobre la superficie celular, en combinación con moléculas coestimuladoras. Mueller *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 7: 445-80 (1989). De hecho, se han detectado antígenos específicos de tumor en una amplia gama de tumores humanos. Roth *et al.*, Adv. Immunol. 57: 281-351 (1994); Boon *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 12: 337-65 (1994).

Algunas estrategias de vacunación contra el cáncer se han centrado en el uso de lisados o células tumorales muertas administradas en combinación con adyuvantes o citocinas. Más recientemente, se ha usado la transferencia génica de citocinas, moléculas de CMH, moléculas coestimuladoras o antígenos tumorales a células tumorales para potenciar la visibilidad de la célula tumoral para células efectoras inmunitarias. Dranoff & Mulligan, Adv. Immunol. 58: 417-54 (1995).

El uso terapéutico de "vacunas contra el cáncer" ha presentado dificultades importantes, sin embargo. En particular, los enfoques convencionales requieren obtener y cultivar células tumorales autólogas de un paciente para su manipulación *in vitro*, irradiación y posterior vacunación, o la identificación y purificación de un antígeno específico de tumor.

Sumario de la invención

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un método para provocar una respuesta inmunitaria antitumoral sistémica en un paciente que presenta múltiples tumores metastásicos sin manipular las células tumorales autólogas del paciente o identificar o purificar antígenos específicos.

También es un objeto de la presente invención proporcionar vectores para efectuar este método.

Para lograr estos y otros objetivos, la presente invención describe un método para provocar una respuesta inmunitaria antitumoral sistémica en un paciente que presenta o que corre el riesgo de desarrollar múltiples tumores metastásicos de un tipo celular dado.

La invención se refiere por tanto a una composición que comprende un virus de herpes simple (VHS) que se replica en células que se dividen y que presenta replicación atenuada en células que no se dividen, y que comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican para GM-CSF, en el que el GM-CSF se expresa, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el virus para su uso en un método para tratar una metástasis de células de melanoma provocando una respuesta inmunitaria antitumoral sistémica en un paciente que presenta múltiples células de melanoma metastásico, en el que se inocula la composición en las células de melanoma del paciente, y en el que dicha composición induce una respuesta inmunitaria que es específica para las células de melanoma y que destruye células de las células de melanoma inoculadas y de células de melanoma no inoculadas.

Según otra realización, el virus es un virus VHS de tipo 1 (VHS1) virus.

Virus mutados útiles en los métodos de la invención son por ejemplo un virus de herpes simple que no puede expresar ni (i) un producto génico de γ 34.5 funcional ni (ii) una ribonucleótido reductasa.

Estos y otros objetos y aspectos de la invención resultarán evidentes para el experto en la técnica en vista de las enseñanzas contenidas en el presente documento.

60

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra que la inoculación intratumoral de tumores CT26 en ratones BALB/c con G207 inhibe el crecimiento del tumor inoculado (rt) y de un tumor no inoculado en un sitio distante (lt). Las barras representan medias \pm EEM de 6 ratones por grupo. Volumen tumoral = (anchura x longitud x altura).

65

La figura 1B muestra que la inoculación intradérmica de tumores CT26 en ratones BALB/c con G207 no tiene un efecto significativo sobre el crecimiento tumoral. Las barras representan medias \pm EEM de 6 ratones por grupo. Volumen tumoral = (anchura x longitud x altura).

5 La figura 1C muestra que el aumento de la dosis intratumoral de G207 da como resultado un crecimiento tumoral bilateral disminuido de tumores CT26 en ratones BALB/c. Las barras muestran el promedio de 6 animales por grupo.

La figura 2 muestra que la inoculación intratumoral de células de melanoma de ratón M3 en ratones DBA/2 con G207 inhibe el crecimiento del tumor inoculado (rt) y un tumor no inoculado distante (lt). Las barras representan medias \pm EEM de 6 ó 7 ratones por grupo. Volumen tumoral = (anchura x longitud x altura).

La figura 3 muestra que la inoculación intratumoral de células de neuroblastoma N18 de ratón en ratones A/J singénicos con G207 inhibe el crecimiento del tumor inoculado (tumor izquierdo) y un tumor no inoculado distante (tumor derecho). Las barras representan medias \pm EEM de 8 ratones por grupo. Volumen tumoral = (anchura x longitud x altura).

La figura 4 muestra que la inoculación intratumoral de tumores CT26 en ratones BALB/c con tsK inhibe el crecimiento del tumor inoculado (Rt) y un tumor no inoculado distante (Lt). Las barras representan medias \pm EEM de 6 ratones por grupo. Volumen tumoral = (anchura x longitud x altura).

20 La figura 5A muestra el plásmido pHCL-tk. La figura 5B muestra el plásmido pHCIL12-tk.

La figura 6 muestra la secreción de IL-12 en células inoculadas con dvIL12/G207.

25 La figura 7 muestra que la inoculación intratumoral de tumores CT26 en ratones BALB/c con dvlacZ/G207 o dvIL12/G207 inhibe el crecimiento del tumor inoculado (Rt) y un tumor no inoculado distante (Lt). Las barras representan medias \pm EEM de 6 ratones por grupo. Volumen tumoral = (anchura x longitud x altura).

30 La figura 8 muestra la tasa de supervivencia de ratones tras la inoculación con dvlacZ/G207, dvIL12/G207 o de manera simulada.

La figura 9 muestra que la inoculación de tumores CT26 en ratones BALB/c con dvIL12/tsK o dvlacZ/tsK inhibe el crecimiento del tumor inoculado (Rt) y un tumor no inoculado distante (Lt). Las barras representan medias \pm EEM de 6 ratones por grupo. Volumen tumoral = (anchura x longitud x altura).

35 La figura 10 muestra la tasa de supervivencia de ratones tras la inoculación con dvlacZ/tsK, dvIL12/tsK o de manera simulada.

40 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Se ha desarrollado un enfoque nuevo y mejorado para provocar una respuesta inmunitaria sistémica en pacientes que presentan múltiples tumores metastásicos. Según estos desarrollos, la presente invención describe un método para provocar una respuesta inmunitaria antitumoral sistémica en un paciente que presenta, o que corre el riesgo de desarrollar, múltiples tumores metastásicos inoculando al menos un tumor con un virus de herpes simple (VHS) mutado. La inoculación produce una respuesta inmunitaria antitumoral altamente específica que destruye células del tumor inoculado, así como células de tumores no inoculados distantes, establecidos.

La capacidad para tratar pacientes que presentan múltiples tumores metastásicos representa una ventaja significativa con respecto a enfoques convencionales que se centran en el tratamiento de una única masa tumoral. La eficacia de los enfoques basados en vectores virales citotóxicos convencionales depende de la infección viral de todas las células tumorales en el paciente. Sin embargo, es extremadamente difícil obtener una distribución amplia o sistémica de vectores virales *in vivo*, y por tanto es difícil infectar a todas las células tumorales de un tumor sólido localizado, y prácticamente imposible infectar a todas las células tumorales en un paciente que presenta múltiples tumores metastásicos. La composición para su uso en un método de la presente invención, que no requiere el direccionamiento de un vector viral a cada célula tumoral, ofrece por tanto una mejora definida con respecto a estos métodos. Además, con las recientes mejoras en la terapia contra el cáncer de tumores primarios, muchos pacientes sobreviven más tiempo y corren el riesgo de desarrollar múltiples tumores metastásicos. Por consiguiente, la capacidad para tratar a estos pacientes eficazmente representa una mejora necesaria en la terapia contra el cáncer.

60 Los virus usados según la presente invención son virus de herpes simple mutados que infectan células tumorales pero que no se propagan eficazmente a ni se replican eficazmente en tejido o células normales, no provocando de ese modo enfermedad o patología por sí mismos. Por ejemplo, un virus que se replica en células que se dividen y presenta replicación atenuada en células que no se dividen es útil según la presente invención. El virus puede ser del tipo 1 (VHS-1) o tipo 2 (VHS-2). Se han usado diversos mutantes de VHS-1 para terapia tumoral citotóxica local para destruir células tumorales *in situ*, aunque evitando el tejido normal. Mineta *et al.*, Nature Medicine 1: 938-43

(1995); Martuza *et al.*, Science 252: 854-56 (1991); Boviatsis *et al.*, Gene Therapy 1: 323-331 (1994); Randazzo *et al.*, Virology 211: 94-101 (1995); Andreansky *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11313-18 (1996). Cualquiera de estos mutantes puede usarse según la presente invención, como también cepas de vacuna de VHS. Están disponibles varios fármacos antivirales (es decir, aciclovir y foscarnet) contra virus de herpes simple que permitirían que se tratara la propagación viral no prevista.

Según la presente invención, el virus se replica en células que se dividen y presenta replicación atenuada en células que no se dividen. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.585.096 describe un virus adecuado, ilustrado por la cepa G207, que no puede expresar ni (i) un producto génico de γ 34.5 funcional ni (ii) una ribonucleótido reductasa. (El contenido de la patente estadounidense n.º 5.585.096 se incorpora en el presente documento por referencia). G207 se replica en células que se dividen, efectuando una infección lítica con la consiguiente muerte celular, pero está altamente atenuado en células que no se dividen, dirigiendo de ese modo la propagación viral a tumores. G207 no es neuropatogénico, no provocando enfermedad detectable en ratones y primates no humanos. Mineta *et al.*, Nature Medicine 1: 938-43 (1995).

Se describe además el uso de un virus que es de replicación defectuosa. Un ejemplo de un virus de este tipo es tsK, un mutante de virus de herpes simple sensible a la temperatura en ICP4. Davison *et al.*, J. Gen. Virol. 65: 859-63 (1984). La capacidad de tsK para replicarse es dependiente de la temperatura, siendo 31,5°C permisivo para replicación, y 39,5°C no permisivo. tsK puede replicarse con capacidad variable entre estas temperaturas. Debido a que la temperatura corporal es de aproximadamente 39,5°C, se espera que tsK sea de replicación defectuosa *in vivo*. Esto se ha confirmado mediante experimentos *in vivo* con tsK en ratas.

Se describe además el uso de un virus que es de replicación competente de manera condicional. Un ejemplo de un virus de este tipo es G92A, cuya capacidad para replicarse es dependiente del tipo celular. G92A se describe en más detalle en la solicitud estadounidense con n.º de serie 08/486,147, presentada el 7 de junio de 1995, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia.

La invención describe además una composición, que consiste esencialmente en el virus de herpes simple y un portador farmacéuticamente aceptable, que se administra a un paciente que padece múltiples tumores metastásicos. La composición se administra directamente a las células tumorales *in situ*. En esta descripción, la frase "que consiste esencialmente en" excluye una etapa u otra característica que afectaría significativamente a un aspecto material de la invención. Así calificada, una composición de esta realización incluiría, por ejemplo, el virus de herpes simple prescrito sin ningún otro virus o vector de virus defectuoso; esto porque un virus adicional complicaría sustancialmente el protocolo de la invención. La invención también abarca la administración de esta composición en combinación con otra terapia, tal como quimioterapia o tratamiento de radiación.

Puede administrarse más de un virus de herpes simple mutado. Esta realización puede efectuarse administrando una única composición que comprende más de un virus de herpes simple mutado y un vehículo farmacéuticamente aceptable para los virus, o administrando más de una composición, comprendiendo cada composición al menos un virus de herpes simple mutado y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el/los virus. Por ejemplo, puede administrarse una composición que comprende (A) un primer virus de herpes simple mutado, (B) un segundo virus de herpes simple mutado y (C) un portador farmacéuticamente aceptable para los virus. Además, puede administrarse una composición que consiste esencialmente en (A) un primer virus de herpes simple mutado, (B) un segundo virus de herpes simple mutado y (C) un portador farmacéuticamente aceptable para los virus. Tal como se expuso anteriormente, la frase "que consiste esencialmente en" excluye una etapa u otra característica que afectaría significativamente a un aspecto material de la invención. Por tanto, esta realización supondría, por ejemplo, la administración de los virus de herpes simple primero y segundo prescritos sin ningún otro virus o vector de virus defectuoso.

La inoculación de un tumor con uno o más virus de herpes simple mutados según la presente invención induce una respuesta inmunitaria específica de tumor sistémica que es específica para el tipo celular del tumor inoculado y que destruye células del tumor inoculado y de otros tumores no inoculados. La muerte celular inducida se observa, por ejemplo, como crecimiento tumoral inhibido o como tamaño tumoral reducido. En los ejemplos expuestos más adelante, la muerte celular inducida se observa como una inhibición del crecimiento del tumor inoculado y de tumores no inoculados distantes, establecidos. En algunos casos, los tumores se encogen hasta tamaños indetectables. En uno de los modelos murinos estudiados, CT26, la respuesta inmunitaria se correlaciona con linfocitos T citotóxicos (CD8⁺) que reconocen un péptido restringido por complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I que es un antígeno tumoral dominante.

Tal como se comentó anteriormente, la composición se administra directamente a células tumorales del paciente, *in situ*. Esto puede lograrse mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante inoculación intratumoral durante la cirugía, tal como cirugía para citoreducir un tumor, en melanomas externos, o de manera estereotáctica en el lecho tumoral. Otros enfoques para seleccionar como diana tumores también son apropiados. Generalmente, se administra la dosis segura máxima a intervalos semanales si el tumor es fácilmente accesible, o se administra durante la cirugía o biopsia tumoral.

El vehículo farmacéuticamente aceptable para el virus puede seleccionarse de vehículos farmacéuticamente aceptables conocidos, y debe ser uno en el que el virus es estable. Por ejemplo, puede ser un diluyente, disolvente, tampón y/o conservante. Un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable es tampón fosfato que contiene NaCl. Otras disoluciones acuosas de vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes no tóxicos, incluyendo sales, conservantes, tampones y similares se describen en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 15ª ed. Easton: Mack Publishing Co. págs. 1405-1412 y 1461-1487 (1975) y THE NATIONAL FORMULARY XIV., 14ª ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975), cuyo contenido se incorpora por el presente documento por referencia.

Huang *et al.*, Science 264: 961-65 (1994), demostraron que la sensibilización de una respuesta inmunitaria contra un antígeno tumoral restringido por CMH de clase I implica la transferencia de ese antígeno a células presentadoras de antígeno (APC) derivadas de médula ósea del huésped antes de su presentación a células T CD8⁺. Sin querer restringirse a ninguna teoría, los presentes inventores creen que la infección por VHS local de un tumor podría inducir que precursores circulantes se diferenciaron a APC. Un subconjunto de macrófagos pueden presentar antígenos exógenos sobre moléculas de CMH de clase I a clones de células T CD8⁺. Rock *et al.*, J. Immunol. 150: 438-46 (1993). La destrucción lítica o muerte inducida viralmente de células tumorales podría liberar antígenos tumorales que entonces captan las APC y los transportan a los ganglios linfáticos de drenaje. Allí se procesarían y presentarían a células T CD8⁺. El reconocimiento asociativo de antígenos específicos de tumor y específicos de VHS también podría desempeñar un papel en la fuerza de la respuesta. Células tumorales infectadas con VHS de replicación competente tendrían viriones en maduración que surgen de sus membranas celulares y también pueden procesar antígenos virales para su presentación a CMH de clase I como hacen las APC. Las células tumorales infectadas por VHS podrían inducir por tanto reacciones inmunitarias mediadas por células T directamente. Parte de la respuesta inmunitaria inducida por la copresentación de antígenos tumorales y virales puede desencadenarse después de eso mediante sólo uno de los antígenos coexpresados.

Uno o más moduladores inmunitarios pueden administrarse a las células tumorales además de los virus de herpes simple mutados descritos anteriormente. Los ejemplos de moduladores inmunitarios incluyen citocinas, moléculas coestimuladoras y quimiocinas. La administración de uno o más moduladores inmunitarios puede efectuarse, por ejemplo, por medio de un virus de herpes simple mutado que comprende una o más secuencias de nucleótidos expresables que codifican para una o más citocinas u otros genes moduladores inmunitarios, o por medio de más de un virus de herpes simple mutado, cada uno de los cuales comprende una o más secuencias de nucleótidos expresables que codifican para una o más citocinas u otros genes moduladores inmunitarios. También pueden usarse vectores distintos de virus de herpes simple para efectuar la administración de uno o más moduladores inmunitarios. Por ejemplo, pueden usarse según esta realización uno o más vectores adenovirales, vectores de virus adenoasociados, vectores retrovirales o vectores de virus vaccinia que comprende una o más secuencias de nucleótidos expresables que codifican para uno o más genes moduladores inmunitarios. Véase, por ejemplo, Shawler *et al.*, Adv. Pharmacol. 40: 309-37 (1997), que comentan la transferencia génica de citocinas inmunoestimuladoras.

Los ejemplos de moduladores inmunitarios que son útiles incluyen IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, G-CSF, IFN- α ; IFN- γ , TNF- α y B7. Véanse, por ejemplo, Parmiani *et al.*, Adv. Pharmacol. 40: 259-89 (1997); Shawler *et al.*, Adv. Pharmacol. 40: 309 (1997). Por conveniencia, el uso de IL-12 se ejemplifica en la discusión que sigue. Sin embargo, ha de entenderse que pueden usarse otros moduladores inmunitarios en su lugar o además de la misma. Además, cuando la presente descripción se refiere a "un modulador inmunitario", ha de entenderse que la invención abarca uno o más moduladores inmunitarios.

La citocina IL-12 es una citocina heterodimérica, compuesta por subunidades de 35 kD (p35) y 40 kD (p40), que se une a receptores presentes en células T y NK. El receptor de alta afinidad está compuesto por dos subunidades de receptor de citocina de tipo β que se comportan individualmente como receptores de baja afinidad. IL-12 desempeña un papel multifuncional en el sistema inmunitario, aumentando la proliferación y actividad citotóxica de células T y células NK, regulando la producción de IFN- γ y promoviendo el desarrollo de células T auxiliares CD4⁺ (Th1).

Se ha demostrado la actividad antitumoral de IL-12 en varios modelos de tumor murino diferentes, tanto sólidos como metastásicos, con administración sistémica de IL-12 recombinante, fibroblastos o células tumorales modificadas por ingeniería genética para secretar IL-12, y vectores virales que expresan IL-12. La inmunoterapia con IL-12 es menos eficaz con otras líneas de células tumorales tales como CT26, C26, MCH-1-A1 y TS/A. Zitvogel *et al.*, Eur. J. Immunol. 26: 1335-41 (1996). Se ha mostrado que la administración sistémica de rIL-12 tiene potentes efectos antitumorales en diversos modelos animales. Sin embargo, la exposición prolongada a IL-12 puede tener efectos secundarios perjudiciales como los observados con muchas citocinas.

La transferencia de genes moduladores inmunitarios directamente a las células tumorales es ventajosa porque los genes se expresan dentro del tumor en el sitio de su acción conjuntamente con antígenos tumorales supuestos. Según la presente invención, por tanto, los tumores se modifican *in situ* para convertir a las células tumorales en una fuente de producción de moduladores inmunitarios.

Tal como se comentó anteriormente, la respuesta inmunitaria provocada según la presente invención destruye

células del tumor inoculado y también destruye células tumorales no inoculadas, incluyendo células de tumores distantes, no inoculados. Este efecto hace que este método sea particularmente útil para tratar pacientes que presentan múltiples tumores metastásicos de un tipo celular dado. También representa una mejora en el tratamiento de tumores no metastásicos, localizados porque el método destruye células tumorales que no selecciona como diana directamente el virus administrado.

Los ejemplos de tipos de células tumorales que pueden tratarse incluyen tipos de células de astrocitoma, oligodendroglioma, meningioma, neurofibroma, glioblastoma, ependimoma, schwannoma, neurofibrosarcoma y meduloblastoma. La composición descrita también es útil en el tratamiento de células de cáncer pancreático, células de carcinoma de próstata, células de cáncer de cabeza y cuello, células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de colon, células de linfoma, células de hepatoma, células de cáncer de ovarios, células de cáncer renal, neuroblastomas, carcinomas de células escamosas, sarcomas y células de carcinoma epidermoide y mesotelioma.

Las realizaciones de la invención se ilustran adicionalmente a través de ejemplos que muestran aspectos de la invención en detalle. Estos ejemplos ilustran aspectos específicos de la invención y no limitan su alcance.

Ejemplos

Ejemplo 1. Eficacia antitumoral de G207 en la línea celular CT26

Se evaluó la eficacia antitumoral de G207 en un modelo de tumor subcutáneo bilateral, establecido con células CT26 tal como se describe a continuación.

Línea celular

La línea celular CT26 de carcinoma colorrectal murino se ha usado ampliamente como modelo de tumor singénico para estudiar la inmunoterapia. Fearon *et al.* Cancer Res. 35: 2975-80 (1988); Wang, *et al.*, J Immunol. 154: 4685-92 (1995); Huang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9730-35 (1996). CT26 es un tumor epitelial de colon trasplantable inducido por inyecciones intrarrectales de N-nitroso-N-metiluretano en ratones BALB/c hembra (H-2^d). Corbett *et al.*, Cancer Res. 35: 2434-39 (1975).

En ratones normales, CT26 es escasamente inmunogénico: 10^3 - 10^4 células pueden provocar un tumor letal y no inducen CTL específicos de tumor detectables. Fearon *et al.*, citado anteriormente; Wang *et al.*, citado anteriormente. AH1, un nonámero no mutado derivado de la proteína de la envuelta (gp70) de un provirus de leucemia murina ectrópica endógena (MuLV), env-1, se ha identificado como el antígeno restringido por CMH de clase I inmunodominante para CT26. Huang *et al.*, citado anteriormente. La transferencia adoptiva de líneas de CTL específicas de péptido ha podido curar tumores subcutáneos establecidos de CT26, demostrando la correlación entre inducción de CTL específicos de tumor y un efecto antitumoral.

El virus de herpes simple no crece en muchas células de rata, y virus atenuados como G207 no crecen bien en muchos tumores de ratón tampoco. Esto contrasta con su excelente crecimiento en la mayoría de las líneas de tumores humanos. Sin embargo, los estudios en líneas de tumores humanos requieren el uso de ratones atímicos. Se eligió CT26 como línea celular modelo tras varios años de intentar encontrar un buen sistema singénico para estudiar los efectos inmunitarios de vectores de herpes que se replican de manera condicional atenuados, tales como G207.

Infección de células CT26

Se inyectaron por vía subcutánea células tumorales (1×10^5) en los costados bilaterales de ratones BALB/c hembra (National Cancer Institute (Rockville, MD)). Cuando estaban creciendo de manera palpable tumores subcutáneos (aproximadamente 5 mm de diámetro), se les inoculó a los ratones unilateralmente en el tumor del lado derecho o bien virus G207 en 50 μ l de tampón de virus (NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 7,5) y medio de Eagle modificado (MEM) (1:1), o con 50 μ l de extracto infectado de manera simulada ("simulado"), preparado a partir de células infectadas de manera simulada usando los mismos procedimientos que los usados para el inóculo de virus. Se administró una segunda inyección de la misma composición 7 días después en algunos experimentos. Se midió el tamaño tumoral mediante un calibre externo. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Georgetown.

Tal como se muestra en la figura 1C, la inoculación con G207 dio como resultado una reducción en el crecimiento tumoral de tanto los tumores inoculados (Rt), así como de sus homólogos contralaterales no inoculados (Lt) en comparación con controles inoculados de manera simulada ($p < 0,0005$ (Rt) y $p < 0,001$ (Lt) en el día 21 tras la infección; prueba de la t no apareada). En el momento de la segunda inoculación, 7 días tras la primera inoculación, se detectó expresión de lacZ a partir de G207 mediante histoquímica de X-gal en el tumor inoculado pero no en el tumor no inoculado.

Dos inoculaciones intratumorales con una dosis inferior de G207 (7×10^3 unidades formadoras de placa (ufp)) indujeron una inhibición del crecimiento significativa de los tumores bilaterales en comparación con los controles ($p < 0,01$ (Rt) y $p < 0,05$ (Lt) en el día 21 tras la infección; prueba de la t no apareada), pero en un menor grado que la dosis superior (véase la figura 1 C).

5 Una única inoculación intratumoral unilateral con 5×10^7 ufp de G207 provocó una gran reducción en el crecimiento de tumores bilaterales (figura 1A), comparable a la inoculación doble con 7×10^5 ufp (figura 1C).

10 El efecto antitumoral sobre el tumor contralateral no inoculado dependía de la inoculación intratumoral de G207, ya que la inoculación intradérmica de G207 en los costados derechos de ratones con tumores unilaterales establecidos en los costados izquierdos no tenía efecto sobre el crecimiento tumoral (véase la figura 1 B).

Papel de las células T en la respuesta inmunitaria

15 Para evaluar el posible papel de células T en la inhibición inducida por virus de herpes simple del crecimiento tumoral según la presente invención, se sometió a prueba la eficacia antitumoral de la inoculación de G207 intratumoral en ratones atímicos. No hubo ningún efecto de la inoculación intratumoral de 7×10^5 ufp de G207. Inoculaciones de G207 a dosis superior (5×10^7 ufp) provocaron una ligera inhibición del crecimiento de tumores inoculados con virus en comparación con tumores inoculados de manera simulada ($p = 0,08$ en el día 10), pero no se observó ningún efecto sobre tumores contralaterales no inoculados. Esta falta de efecto sobre tumores contralaterales en ratones atímicos indica un componente de células T en la respuesta inmunitaria provocada.

Respuesta de CTL específicos de tumor

25 Para determinar si el virus de herpes simple induce una respuesta de CTL específicos de tumor, se generaron células efectoras *in vitro* a partir de esplenocitos obtenidos 12 días tras la primera inoculación de virus (G207) y se sometieron a prueba en un ensayo de liberación de ^{51}Cr .

30 Se cultivaron suspensiones de células individuales de esplenocitos (3×10^6) de ratones individuales tratados con G207 o de manera simulada con 1×10^6 células CT26 tratadas con mitomicina ($100 \mu\text{g/ml}$ de mitomicina C durante 1 h). Se recogieron las células efectoras tras 6 días de cultivo *in vitro* y se mezclaron con células diana a las razones indicadas. Se incubaron las células diana con $50 \mu\text{Ci}$ de $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (^{51}Cr) durante 60 min. Se realizaron ensayos de liberación de ^{51}Cr de cuatro horas tal como se describe en Kojima *et al.*, *Immunity* 1: 357-64 (1994). Se calculó el % de lisis específica a partir de muestras por triplicado tal como sigue:

35
$$[(\text{cpm experimentales} - \text{cpm espontáneas}) / (\text{cpm máximas} - \text{cpm espontáneas})] \times 100.$$

40 A20 es una línea celular de linfoma de células B (Ig^+ , Ia^+ , H-2^{d}) derivada de una neoplasia de células reticulares espontánea en ratones BALB/c. Kim *et al.*, *J. Immunol.* 122: 549-54 (1979). Puede presentar antígeno proteico a linfocitos T reactivos con antígenos restringidos por CMH. Glimcher, *et al.*, *J. Exp. Med.* 155: 445-59 (1982).

45 Los ratones tratados de manera intratumoral con G207 generaron una respuesta de CTL altamente específica contra células CT26 pero no contra células de linfoma A20 (también H-2^{d}). No se detectó respuesta de CTL específica en ratones tratados por vía intradérmica con G207 o de manera intratumoral con extracto simulado. Hubo una pequeña respuesta de CTL no específica (contra A20 y CT26) inducida en ratones inoculados de manera simulada.

50 También se evaluó la capacidad de los CTL generados en ratones inoculados de manera intratumoral con el virus de herpes simple para reconocer el péptido antigénico restringido por CMH de clase I inmunodominante en CT26, AH1. AH1, el nonúmero SPSYVYHQF, es el péptido inmunodominante de CT26, presentado por la molécula L^{d} del CMH de clase I. El péptido AH1 que se une a L^{d} se deriva de gp70, uno de los dos productos del gen env del MuLV endógeno. Huang *et al.*, citado anteriormente, demostraron que células CT26 expresan el producto del gen env de MuLV mientras que el tejido normal de ratones BALB/c no lo hacen, y que el antígeno viral, gp70, puede servir como posible antígeno de rechazo tumoral para el sistema inmunitario. Peptide Technologies (Washington, D.C.) sintetizó el péptido AH1 hasta una pureza de $>99\%$ tal como se determina mediante HPLC y análisis de aminoácidos.

55 P815AB.35-43 restringido por H-2L^{d} , LPILGWLVF, es el péptido inmunodominante derivado de células P815 de mastocitoma murino. Van den Eynde *et al.*, *J. Exp. Med.* 173: 1373-84 (1991).

60 Las células efectoras de ratones inoculados con G207 intratumoral presentaban lisis específica de células CT26 y de células A20 pulsadas con péptido AH1 restringido por L^{d} , pero no de células A20 pulsadas con péptido P815AB restringido por L^{d} . La actividad de CTL *in vitro* se suprimió completamente por el agotamiento de células CD8^+ , pero no por el agotamiento de células CD4^+ .

65 La inoculación intradérmica con virus G207 o la inoculación intratumoral con extracto simulado no potenció la activación de células T específicas contra tumores CT26. En cambio, la sensibilización *in vivo* contra tumores que expresan antígenos endógenos mediante inoculación intratumoral de G207 indujo una respuesta de CTL específica

de péptido antigénico. Estos resultados indican que la inoculación de tumores con un virus de herpes simple puede superar los posibles mecanismos de tolerancia a la expresión de antígenos endógenos. La falta de una respuesta antitumoral contra tumores no inoculados en ratones atímicos y la pérdida de actividad de CTL por el agotamiento de células CD8⁺ *in vitro* sugiere un papel importante del reconocimiento por CTL restringido por CMH de clase I, mediado por células T.

Ejemplo 2. Eficacia antitumoral de G207 en células de melanoma de ratón M3

Se inocularon bilateralmente células de melanoma de ratón M3 (3×10^5) en los costados de ratones DBA/2. Cuando los tumores tenían 5 mm de diámetro máximo, se inoculó el tumor del costado derecho una vez con o bien 5×10^7 ufp de G207 o bien una cantidad equivalente de preparación de células Vero simuladas (como control negativo).

La inoculación con G207 inhibió el crecimiento del tumor inoculado ($p < 0,0005$), y también inhibió significativamente el crecimiento del tumor no inoculado ($p < 0,02$). Figura 2.

Ejemplo 3. Eficacia antitumoral de G207 en células de neuroblastoma N18 de ratón

Tumores subcutáneos bilaterales

Se implantaron por vía subcutánea células de neuroblastoma N18 de ratón bilateralmente en ratones A/J singénicos. Ocho días tras la implantación del tumor, se inyectaron 10^7 ufp de G207 o de manera simulada en el tumor izquierdo. En seis de ocho animales, la inoculación con G207 dio como resultado la desaparición de los tumores en ambos lados. Figura 3.

Tumores subcutáneos e intracerebrales

Se implantaron por vía subcutánea células de neuroblastoma N18 bilateralmente en el costado izquierdo de ratones A/J. Tres días después, se implantaron por vía intracerebral células de neuroblastoma N18 en el lóbulo frontal derecho de los ratones. En los días 10 y 13, se les inyectó a los tumores subcutáneos sólo G207 (11 ratones) o de manera simulada (11 ratones). En el plazo de 35 días de la implantación cerebral, todos los ratones tratados de manera simulada murieron por o tenían tumores intracerebrales. Cuatro de once ratones tratados con G207 no tenían tumores intracerebrales, y un ratón tratado con G207 era un superviviente a largo plazo. El tratamiento con G207 inhibió el crecimiento de tumores intracerebrales distantes y aumentó la supervivencia de animales que portaban tumores ($P < 0,05$ mediante la prueba de Wilcoxon).

Reexposición con N18

A diez ratones A/J sin exposición previa a células N18 (grupo sin tratamiento previo), treinta ratones A/J que habían rechazado espontáneamente inyecciones subcutáneas previas de células N18 (grupo de rechazo) y doce ratones A/J que habían establecido previamente tumores subcutáneos N18 que se curaron mediante inyección intratumoral de G207 (grupo curado), se les inyectó por vía subcutánea células N18. Ninguno de los animales del grupo curado mostró ningún signo de crecimiento tumoral, mientras que un gran número de animales de los grupos sin tratamiento previo y de rechazo mostraron un crecimiento tumoral significativo.

Ejemplo 4. Eficacia antitumoral de tsK

Se implantaron por vía subcutánea células de carcinoma de colon CT26 de ratón bilateralmente en ratones BALB/c singénicos. Se inyectaron 10^5 ufp de tsK, un mutante de virus de herpes simple sensible a la temperatura en ICP4, o se inyectó de manera simulada en el tumor derecho, y se administró una segunda inoculación de la misma composición siete días después (día 7). La inoculación con tsK dio como resultado una inhibición significativa del crecimiento tumoral en ambos tumores ($p < 0,05$ en el día 21). Figura 4.

Ejemplo 5. Eficacia antitumoral de un vector defectuoso que contiene IL-12 y virus auxiliar G207

Se usó la línea celular de carcinoma colorrectal murino CT26 para evaluar la eficacia antitumoral de un vector defectuoso que contiene IL-12 y G207 como virus auxiliar.

Generación de vectores defectuosos

Se construyeron dos plásmidos de amplicón de tamaño similar, pHCL12-tk y pHCL-tk, que codificaban para las dos subunidades de IL-12 murina (p40 y p35) o lacZ, respectivamente, bajo el control del promotor de CMVIE (véanse las figuras 5A y 5B). Puesto que IL-12 es funcional como heterodímero, se expresaron ambas subunidades a partir de un único vector defectuoso, como un mensaje bicistrónico, por medio de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES).

Se construyó el plásmido de amplicón de casete doble pHCL-tk insertando el gen de timidina cinasa (TK) de VHS-1

y el fragmento de BamH1 de extremos romos de pHSV-106 (Life Technologies, Inc., Rockville, MD) en el sitio Spe I de extremos romos de pHCL (figura 5A).

La región codificante de p40, el fragmento de BamH1 de BL-pSV40, ADNc para IL-12 murina p35 y un IRES del virus de la encefalomiocarditis equina (EMCV) de DFG-mIL-12 (IRES-p35), y el fragmento de BamH1 de DFG-mIL12, se subclonaron en LITMUS 28 (New England Biolabs, MA) en el sitio BglII/BamH1 para generar p40-IRES-35. Se construyó el plásmido de amplicón de casete doble que codifica para IL-12, pHCL12-tk, mediante inserción del casete de p40-IRES-p35, el fragmento de SnaB1/AflII, en el sitio Sall de extremos romos de pSR-ori y luego insertando el fragmento de BamH1 de extremos romos de TK de VHS en el sitio SphI de extremos romos para producir pHCL12-tk. Figura 5B.

Se usó G207, que contiene delecciones en ambas copias del gen de γ 34.5 y una inserción de *lacZ* de *E. coli* que inactiva el gen de ICP6, como virus auxiliar para la generación de reservas de vector defectuoso (dv). Se cotransfectaron células Vero con ADN de plásmido de amplicón purificado (pHCL12-tk y pHCL-tk) y ADN viral de G207 usando lipofectAMINE™ (Life Technologies, Inc., Rockville, MD), tal como describe el fabricante, y luego se cultivaron a 34,5°C hasta que presentaban un efecto citopático completo. Entonces se recogió el virus y se sometió a pase a una dilución 1:4 en células Vero hasta que se observó inhibición de la replicación del virus auxiliar. El vector defectuoso que contiene IL-12 se denomina dvIL12/G207 y el vector defectuoso que contiene *lacZ* se denomina dvlacZ/G207.

Titulación de reservas de vector defectuoso

Se titularon reservas de vector defectuoso tras un régimen de congelación-descongelación/sonicación y eliminación de residuos celulares mediante centrifugación a baja velocidad (2000 x g durante 10 min a 4°C). Se expresó el título de virus auxiliar G207 como el número de ufp tras el ensayo de placas en células Vero a 34,5°C. Para dvIL12/G207, se determinó la expresión de IL-12 y se usó el pase con el nivel más alto (pase 4) con un título de virus auxiliar G207 de 5×10^7 ufp/ml. El título de dvlacZ/G207, determinado mediante recuento de células individuales positivas para histoquímica de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) (unidades de partículas defectuosas, upd) tras la formación de placas por G207, era de 5×10^6 upd/ml y 5×10^7 ufp/ml de virus auxiliar.

Cultivo celular

Se cultivaron células de riñón de mono verde africano (Vero) en DMEM que contenía suero de ternera al 10% (CS). Se hicieron crecer células de adenocarcinoma de colon de ratón MC-38, melanoma de ratón Harding-Passey, MDA-adenocarcinoma de mama humano MB-435 y CT26 en DMEM que contenía FCS inactivado por calor al 10% (Hyclone, Logan, UT) y penicilina-estreptomina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO). Se hizo crecer A20, una línea celular de linfoma de células B (Ig⁺, Ia⁺, H-2^d) derivada de una neoplasia de células reticulares espontánea en ratones BALB/c (Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD, ATCC TIB 208) en RPMI 1640 que contenía FCS inactivado por calor al 10%, 50 μ M de 2-ME, glutamina 2 mM, tampón Hepes 20 mM y penicilina-estreptomina.

Detección de IL-12

Se determinó la expresión y secreción de IL-12 mediante ensayo ELISA tras la infección de células tumorales en cultivo a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 ufp por célula.

24 horas tras la infección, se retiraron alícuotas de sobrenadante de células infectadas, se congelaron rápidamente en un baño de hielo seco/etanol y se almacenaron a -80°C para la detección de IL-12. Se recogieron tumores y sangre de ratones tratados con vector defectuoso y se congelaron inmediatamente en un baño de hielo seco/etanol. Se homogeneizó el tejido congelado en PBS enfriado con hielo que contenía PMSF 500 μ M, leupeptina 0,5 μ g/ml y pepstatina 0,7 μ g/ml. Entonces se sonicó el homogenado dos veces durante 10 segundos y se aclaró mediante centrifugación en una microcentrífuga durante 5 min a 4°C. Se determinaron los niveles de IL-12 inmunorreactiva mediante ELISA de tipo sándwich, usando pares de Ac y rIL-12. Se diluyeron los patrones de rIL-12 en el mismo medio o tampón que las muestras (es decir, suero de ratón para las muestras de suero).

En resumen, se incubaron placas de 96 pocillos recubiertas con un AcM anti-IL-12 de ratón (9A5) durante la noche a temperatura ambiente con las muestras de prueba. Tras los lavados, se incubaron las placas con Ac anti-IL-12 de ratón marcado con peroxidasa p40 (5C3) durante 2 horas y entonces se revelaron. Se midió la absorbancia a 450 nm.

La infección de células CT26 (carcinoma de colon murino), Harding-Passey (melanoma murino), MCA38 (adenocarcinoma de colon murino) y MDA-MB-435 (adenocarcinoma de mama humano) con dvIL12/G207 dio como resultado la secreción de hasta 1,5 ng de IL-12 murina/10⁵ células tumorales en 24 horas. Figura 6. No se detectó IL-12 en los sobrenadantes de cultivos de células tumorales no infectadas o las infectadas con dvlacZ/G207. Los niveles de síntesis y secreción de IL-12 alcanzaron el máximo 1 día tras la infección con dvIL12/G207 de células

CT26 y disminuyó hasta niveles indetectables a los 3 días tras la infección, debido probablemente a muerte celular.

Modelo de tumor subcutáneo

5 Se obtuvieron ratones BALB/c y BALB/c (nu/nu) del National Cancer Institute o Charles River (Wilmington, MA). Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Georgetown.

10 Se inyectaron células tumorales CT26 (1×10^5) por vía subcutánea (s.c.) en los costados bilaterales de ratones. Cuando estaban creciendo de manera palpable tumores s.c. (aproximadamente 5 mm de diámetro máximo), se les inoculó a los ratones unilateralmente en el tumor del lado derecho o bien 50 μ l de vector de VHS defectuoso (7×10^5 ufp de virus auxiliar) en tampón de virus (NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 7,5) o bien 50 μ l tampón de virus, seguido por una segunda inyección de la misma composición 7 días después. Cuando se indicó, se usó extracto simulado en lugar de tampón de virus. Se usó DvlacZ/G207 en vez de virus auxiliar G207 como control para la inoculación de
15 dvlL12/G207 de modo que se explicaran las diferencias en factores virales (es decir, razón de partícula:ufp) presentes en reservas de vector defectuoso frente a reservas de G207. Tanto G207 como dvlacZ contienen lacZ de *E. coli* y por tanto el vector defectuoso de control no expresaba antígenos foráneos adicionales.

20 Se midió el tamaño tumoral mediante un calibre externo y se calculó el volumen tumoral ($V = h \times w \times d$). Si los animales parecían moribundos o el diámetro de sus tumores s.c. alcanzaba 18 mm, se sacrificaron y se registró esto como la fecha de la muerte para los estudios de supervivencia. Se calcularon las diferencias estadísticas usando StatView 4.5 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA) en donde se evaluó el volumen tumoral medio mediante la prueba de la t no apareada, las medias de supervivencia mediante ANOVA (comparaciones a posteriores de Fisher) y las diferencias en la supervivencia mediante la prueba de rangos logarítmicos (Mantel-Cox).

25 Inoculación con dvlL12/G207 provocó un efecto antitumoral muy relevante, demostrando ambos de los tumores inoculados así como sus homólogos contralaterales no inoculados una reducción significativa en el crecimiento tumoral. Figura 7. Dos de seis de los tumores inoculados con dvlL12/G207 experimentaron regresión hasta un tamaño indetectable. La inoculación con dvlacZ/G207 también dio como resultado una reducción significativa en el
30 crecimiento tumoral de tumores tanto inoculados como no inoculados en comparación con los controles, aunque en un grado mucho menor que dvlL12/G207. Figura 7.

35 También se realizó un seguimiento de los ratones para determinar la supervivencia, en donde se produjo el sacrificio cuando cualquiera de los tumores bilaterales se hicieron mayores de 18 mm de diámetro. La supervivencia de los animales tratados con vectores defectuosos refleja por tanto el crecimiento de los tumores no inoculados y era significativamente más larga que la de los animales de control. Los ratones tratados unilateralmente con dvlL12/G207 sobrevivieron más tiempo que los ratones tratados con dvlacZ/G207 (figura 8). Se detectó IL-12 en los tumores inoculados con dvlL12/G207 uno y cinco días tras la inoculación (aproximadamente 50-100 pg/tumor), sin detectarse IL-12 en el suero.

40 Papel de las células T en la respuesta inmunitaria

45 Para evaluar el posible papel de células T en la respuesta antitumoral inducida por vector de VHS defectuoso, se establecieron tumores s.c. de CT26 bilaterales en ratones BALB/c atímicos (*nu/nu*). Como con el modelo murino inmunocompetente comentado anteriormente, se realizó la inoculación intratumoral unilateral de dvlL12/G207, dvlacZ/G207 o extracto simulado en los tumores del lado derecho cuando podían palpase (aproximadamente 5 mm de diámetro máximo), y se administró una segunda inoculación de la misma composición siete días después.

50 Aunque había un ligero retardo en el crecimiento de los tumores del lado derecho en los que se inyectó dvlL12/G207, no se observó inhibición del crecimiento tumoral significativa en los tumores no inoculados contralaterales o inoculados. Los tumores CT26 crecieron algo más rápido en los ratones atímicos que en los ratones inmunocompetentes.

55 Respuesta de CTL específicos de tumor

Para someter a prueba si la inhibición del crecimiento tumoral estaba asociada con el aumento de la actividad de CTL, se examinó la capacidad de la inoculación intratumoral con vectores de VHS defectuosos para provocar actividad de CTL específicos de CT26 usando un ensayo de liberación de ^{51}Cr .

60 Se inocularon ratones BALB/c con dvlL12/G207 o dvlacZ/G207 de manera intratumoral cuando los tumores s.c. alcanzaron aproximadamente 5 mm de diámetro máximo, y se administró una segunda inoculación de la misma composición siete días después. Se cultivaron suspensiones de células individuales de esplenocitos en medio RPMI 1640 con FCS inactivado al 10%, 2-ME 50 μ M, glutamina 2 mM, Hepes 20 mM y penicilina-estreptomycinina en placas de 24 pocillos a una concentración de 3×10^6 células/ml. Además, se añadieron al medio o bien 1×10^6 células
65 CT26 inactivadas o bien 1 μ g/ml de péptido AH1. Para la inactivación, se incubaron células tumorales CT26 durante

1 hora en medio de cultivo que contenía 100 µg/ml de mitomicina C y luego se lavaron 2 veces. Se recogieron las células efectoras tras 6 días de cultivo *in vitro*.

Se realizaron ensayos de liberación de ^{51}Cr de cuatro horas tal como se describió anteriormente. En resumen, se incubaron las células diana con 50 µCi de $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (^{51}Cr) durante 60 min. Se pulsaron células A20 con 1 µg/ml de los péptidos restringidos por L^d AH1 o P815AB durante 1 h antes del marcaje. Entonces se mezclaron las células diana con células efectoras durante 4 h a las razones de E/T indicadas. Se determinó la cantidad de liberación de ^{51}Cr tal como se determina mediante recuento de γ , y se calculó el porcentaje de lisis específica a partir de muestras por triplicado tal como sigue:

$$[(\text{cpm experimentales} - \text{cpm espontáneas}) / (\text{cpm máximas} - \text{cpm espontáneas})] \times 100.$$

Células efectoras de ratones tratados con dVL12/G207 reestimuladas con células CT26 tratadas con mitomicina-C presentaban lisis específica de células diana CT26 y de células A20 pulsadas con péptido AH1. No se observó lisis aparente de células A20 no pulsadas o células A20 pulsadas con péptido P815AB restringido por L^d . Células efectoras reestimuladas con péptido AH1 de ratones tratados con dVL12/G207 o dVlacZ/G207 presentaban lisis específica de células diana A20 pulsadas con péptido AH1 y de células CT26, pero no de células A20 no pulsadas. El nivel de actividad de CTL generada por dVL12/G207 era significativamente mayor que el generado por dVlacZ/G207. Células efectoras de animales inoculados con dVL12/G207, no reestimulados, podían lisar específicamente células CT26 pero no A20.

También se determinó el efecto de la expresión de IL-12 intratumoral sobre la acumulación de subtipos de linfocitos T particulares o la producción de IFN- γ . Se aislaron esplenocitos cinco días tras la segunda inoculación de dVL12/G207 o dVlacZ/G207 y se sometieron a prueba para determinar la producción de IFN- γ mediante ELISA y subconjuntos de linfocitos T esplénicos mediante análisis de FACS. En resumen, se lavaron suspensiones de células individuales de esplenocitos y se resuspendieron en medio RPMI 1640 que contenía FCS inactivado al 10%. Se cultivaron células ($3 \times 10^6/\text{ml}$) en placas de 24 pocillos durante 24 h. Se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo mediante un ELISA de tipo sándwich usando pares de Ac anti-IFN- γ obtenidos de Endogen (Woburn, MA).

Se encontraron porcentajes similares de células T auxiliares (CD4) y células T citotóxicas (CD8a) en ratones tratados con dVL12/G207 y dVlacZ/G207. Los esplenocitos de ratones tratados con dVL12/G207 producían cantidades significativamente mayores de IFN- γ que los de ratones tratados con dVlacZ/G207, tal como se muestra a continuación.

Tratamiento	IFN- γ (ng/ml)
dVL12	16 ± 6
dVlacZ	1,6 ± 0,6

Ejemplo 6. Eficacia antitumoral de un vector que contiene tsK e IL-12

Se prepararon vectores defectuosos que contenían IL-12 y tsK o lacZ y tsK. Se prepararon los plásmidos de vectores defectuosos pHCL12-tk y pHCL-tk tal como se describió anteriormente. Se generaron vectores defectuosos mediante cotransfección de células Vero con ADN de tsK de virus auxiliar y pHCL12-tk o pHCL-tk. Se incubaron las células transfectadas a 31,5°C (una temperatura permisiva para la replicación para tsK) hasta que se observó un efecto citopático total. Entonces se sometieron a pase las células tal como se describió anteriormente para virus auxiliar G207. Véase también Kaplitt *et al.*, Mol. Cell. Neurosci. 2: 320-30 (1991). El vector defectuoso que contiene IL-12 se denomina dVL12/tsK y el vector defectuoso que contiene lacZ se denomina dVlacZ/tsK.

Se implantaron por vía subcutánea células de carcinoma de colon de rata CT26 bilateralmente en ratones BALB/c singénicos, tal como se describió anteriormente. Se inoculó el tumor derecho con o bien dVlacZ/tsK, dVL12/tsK o bien de manera simulada, y se administró una segunda inoculación de la misma composición siete días después. La inoculación con dVlacZ/tsK dio como resultado una inhibición significativa del crecimiento tumoral en ambos tumores ($p < 0,01$ en el día 22). La inoculación con dVL12/tsK dio como resultado una mayor inhibición de crecimiento tumoral en ambos tumores en comparación con el tumor inoculado con dVlacZ/tsK ($p < 0,001$). Figura 9.

También se siguió la supervivencia de los ratones inoculados. Se sacrificaron los ratones cuando estaban moribundos o cuando sus tumores alcanzaron más de 18 mm de diámetro. Tal como se muestra en la figura 10, los ratones inoculados con dVlacZ sobrevivieron significativamente más tiempo que los ratones inoculados de manera simulada ($p < 0,01$), y los ratones inoculados con dVL12/tsK sobrevivieron significativamente más tiempo que los ratones inoculados con dVlacZ/tsK o de manera simulada ($p < 0,01$).

Ejemplo 7. Eficacia antitumoral de un vector que contiene tsK y GMCSF

Se implantaron por vía subcutánea células de melanoma Harding-Passey en los costados bilaterales de ratones

- 5 C57BL/6. Cuando los tumores tenían aproximadamente 5 mm de diámetro máximo (día 0), se les inyectó a los tumores del costado derecho vector defectuoso *dvlacZ/tsk* (generado a partir del plásmido de amplicón *pHCL-tk* y que expresa *lacZ* de *E. coli*) o *dvGMCSF/tsK* (generado a partir del plásmido de amplicón *pHCGMCSF-tk*, cuya estructura es la misma que *pHCIL12-tk* excepto porque contiene ADNc de GMCSF de ratón en lugar de ADN de IL-12; se detectó la expresión de GM-CSF mediante ELISA) y virus *tsK* auxiliar, o con tampón de virus. Los ratones tratados con *dvGMCSF/tsK* mostraron una supervivencia aumentada con respecto a ratones tratados con *dvlacZ/tsk* o tampón, y mostraron un crecimiento tumoral disminuido en ambos tumores bilaterales.
- 10 Ha de entenderse que la descripción, los ejemplos específicos y los datos, aunque indican realizaciones a modo de ejemplo, se facilitan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención. Diversos cambios y modificaciones dentro de la presente invención resultarán evidentes para el experto en la técnica a partir de la discusión, la divulgación y los datos contenidos en el presente documento, y por tanto se consideran parte de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende
- 5 un virus de herpes simple (VHS) que se replica en células que se dividen y presenta replicación atenuada en células que no se dividen, y que comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican para GM-CSF, en el que el GM-CSF se expresa, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el virus
- 10 para su uso en un método para tratar una metástasis de células de melanoma provocando una respuesta inmunitaria antitumoral sistémica en un paciente que presenta múltiples células de melanoma metastásico,
- 15 en la que células de melanoma del paciente se inoculan con la composición, y en la que dicha composición induce una respuesta inmunitaria que es específica para las células de melanoma y que destruye células de las células de melanoma inoculadas y de células de melanoma no inoculadas.
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el VHS no puede expresar ni un producto génico de $\gamma 34.5$ funcional ni una ribonucleótido reductasa.
- 20 3. Composición para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que el virus es un virus VHS de tipo 1 (VHS1) virus.

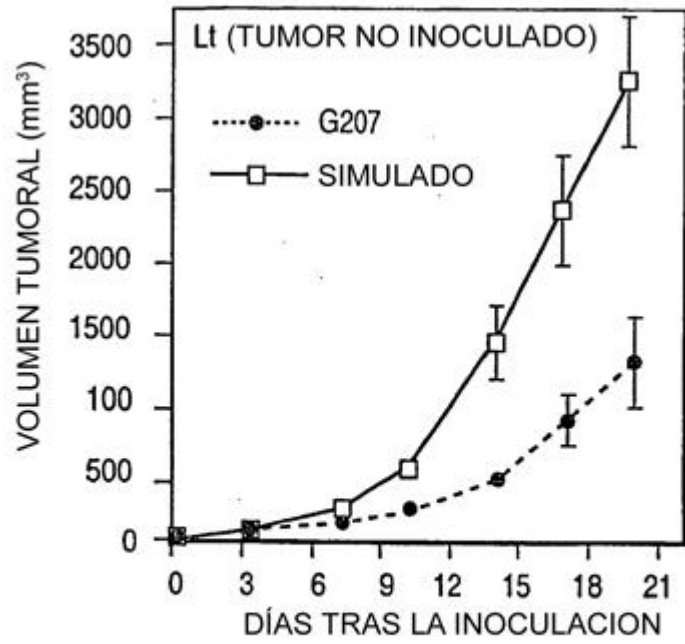


FIG. 1A-1

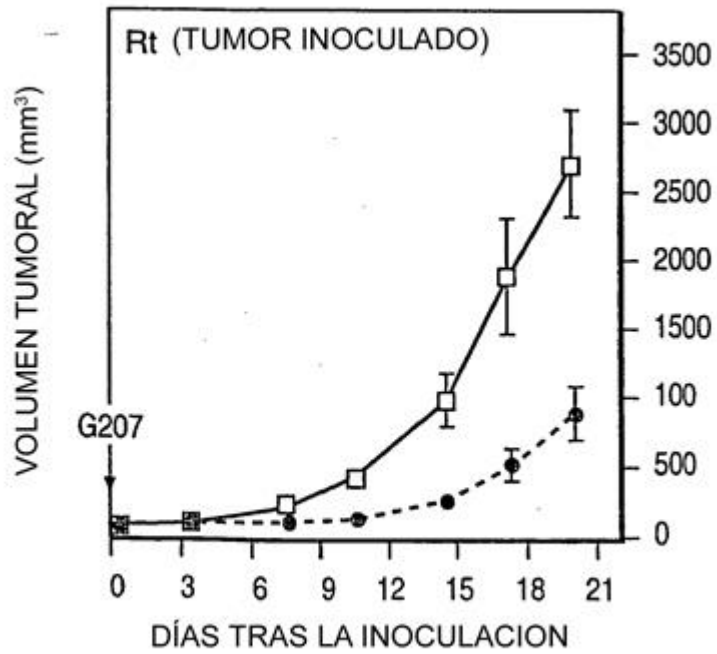


FIG. 1A-2

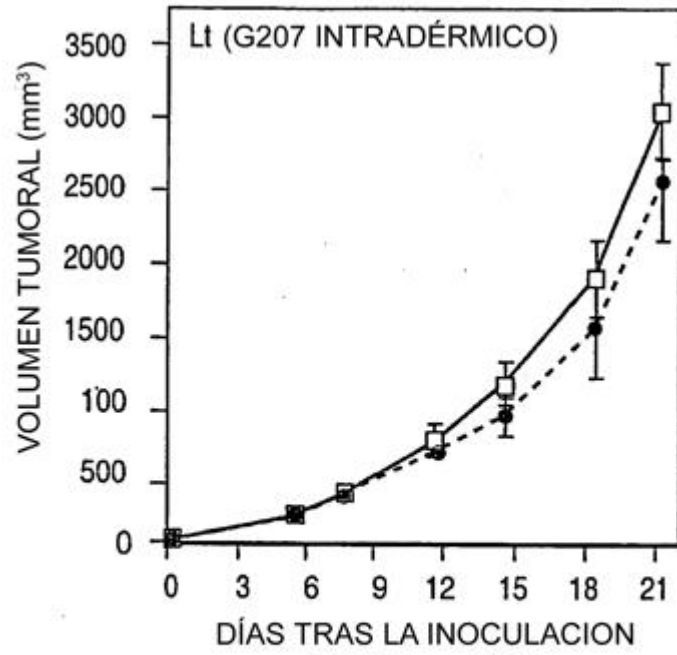


FIG. 1B

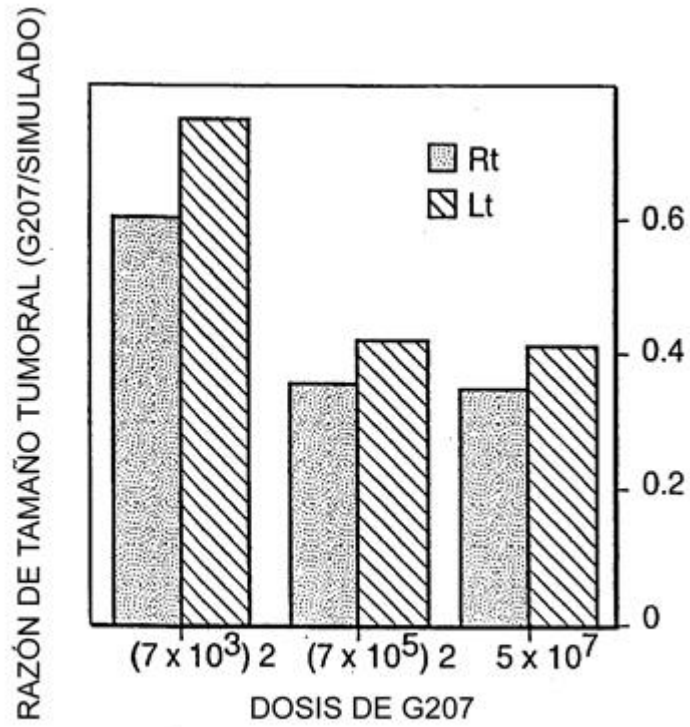


FIG. 1C

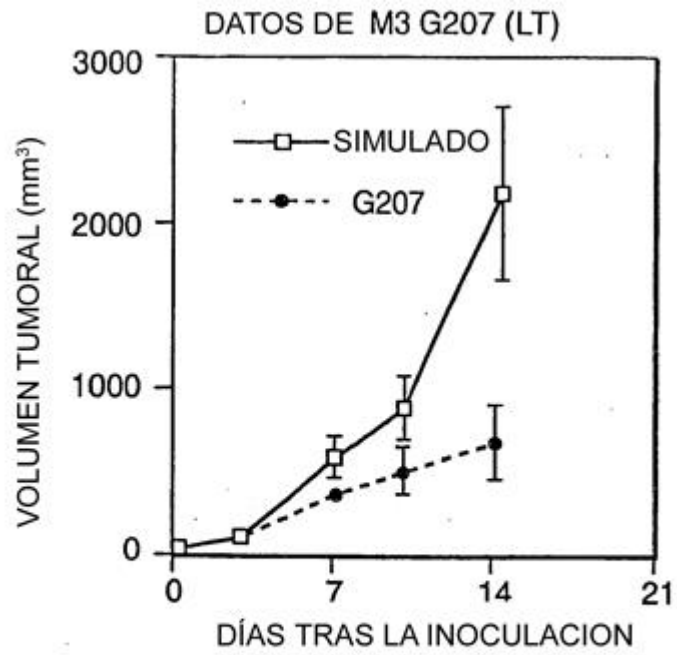


FIG. 2-1

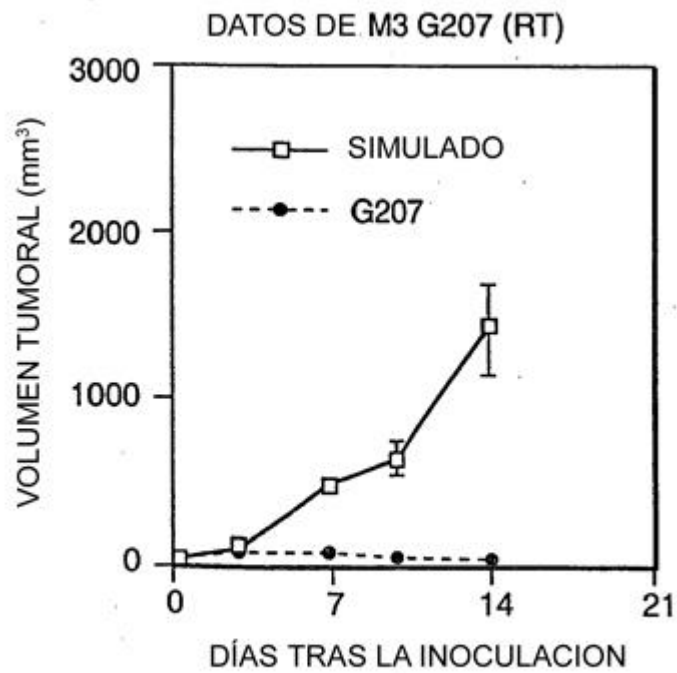


FIG. 2-2

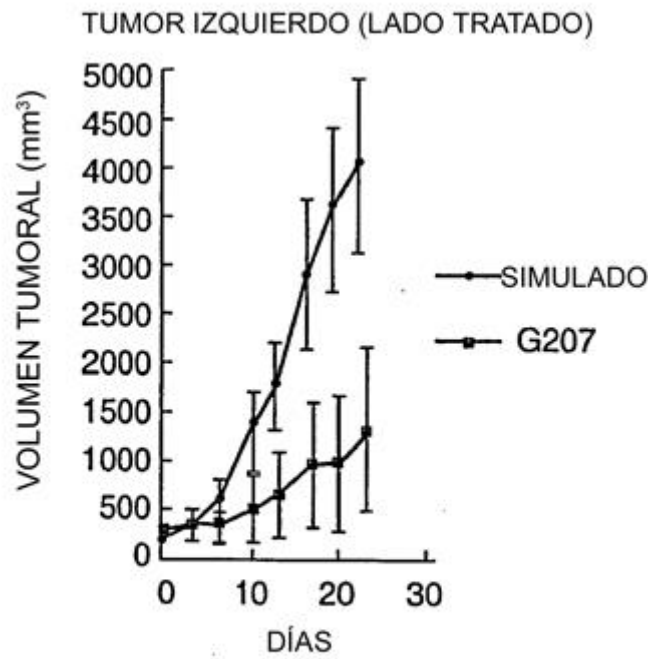


FIG. 3-1

TUMOR DERECHO (LADO CONTRALATERAL)

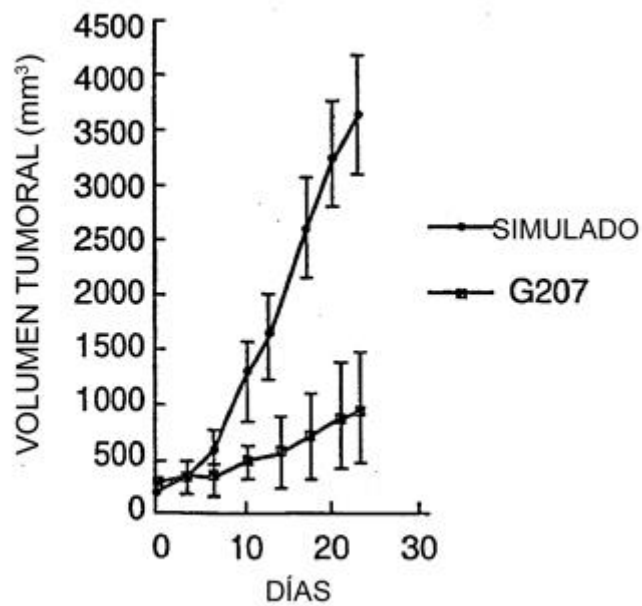


FIG. 3-2

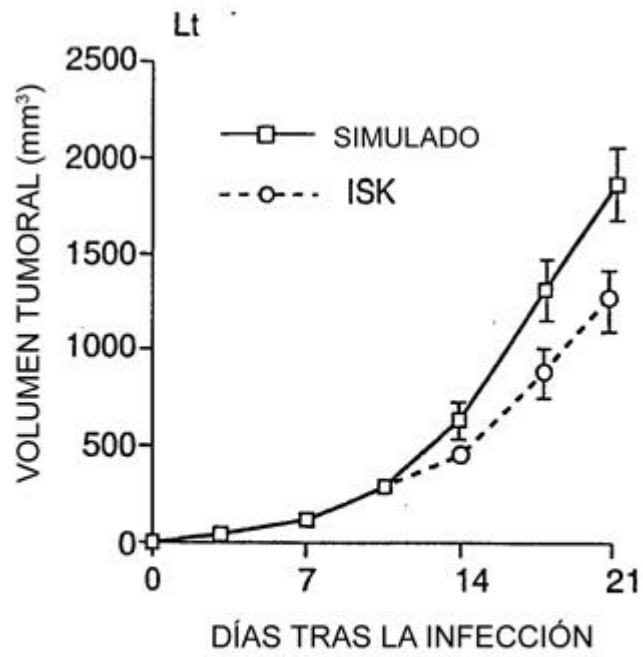


FIG. 4-1

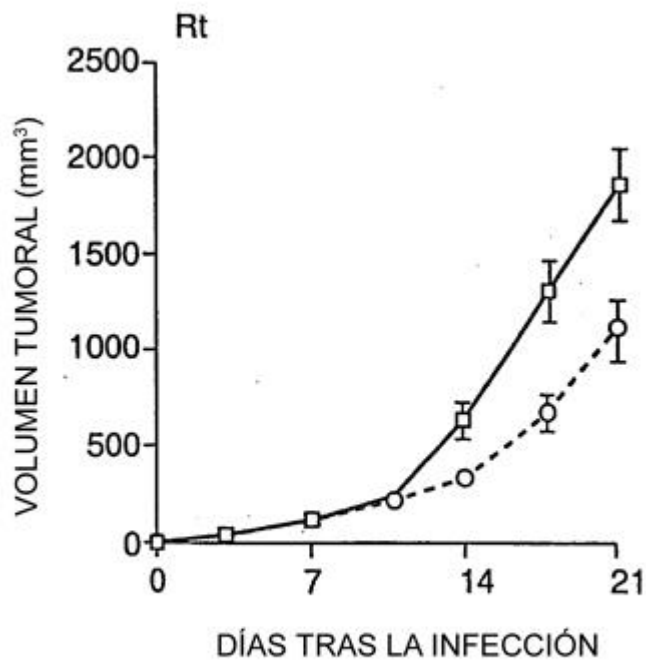


FIG. 4-2

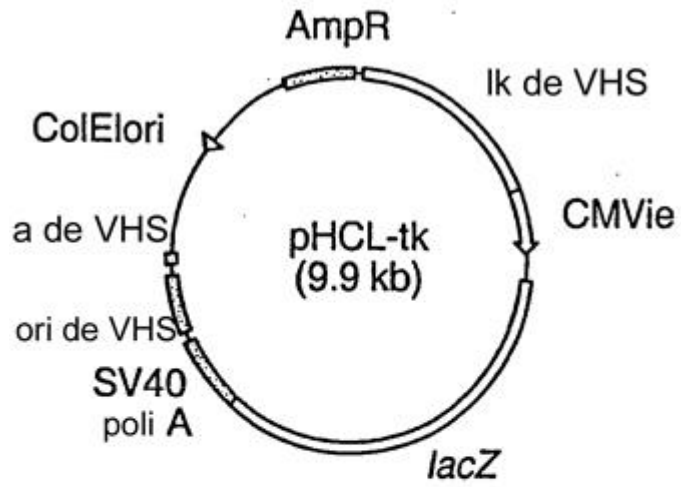


FIG. 5A

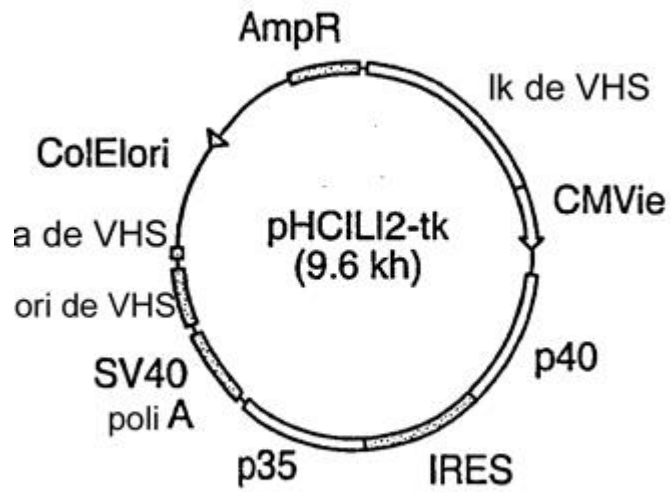


FIG. 5B

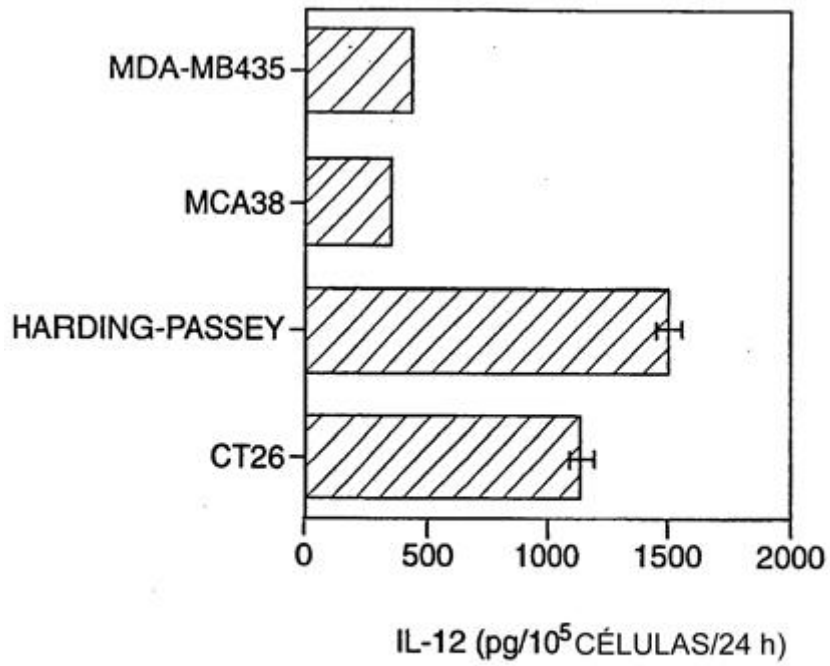


FIG. 6

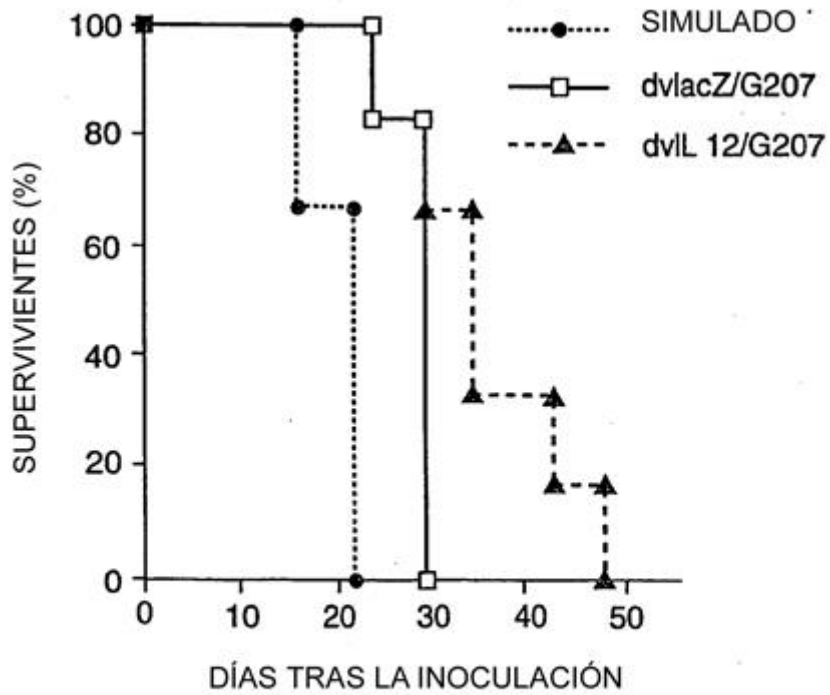


FIG. 8

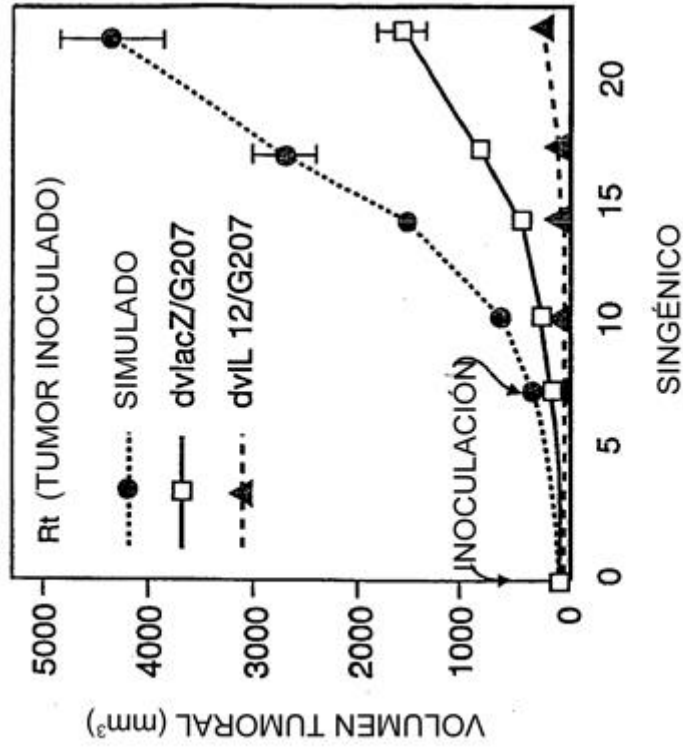


FIG. 7B

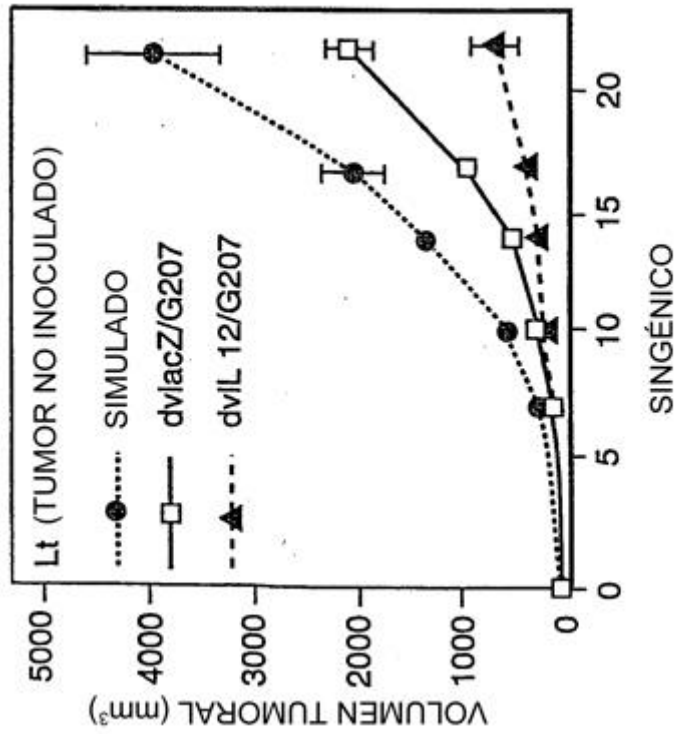


FIG. 7A

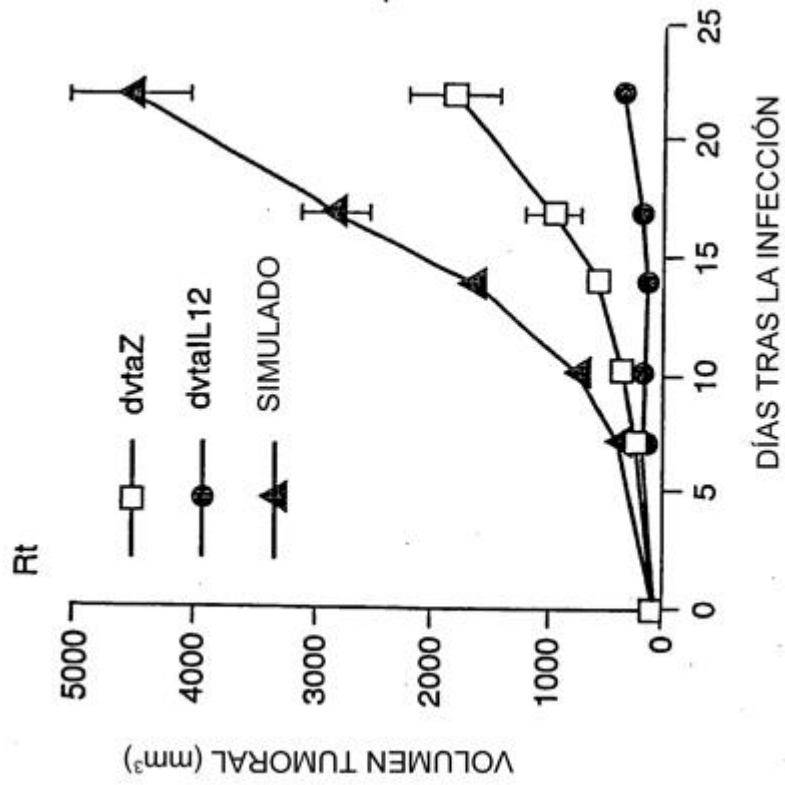


FIG. 9B

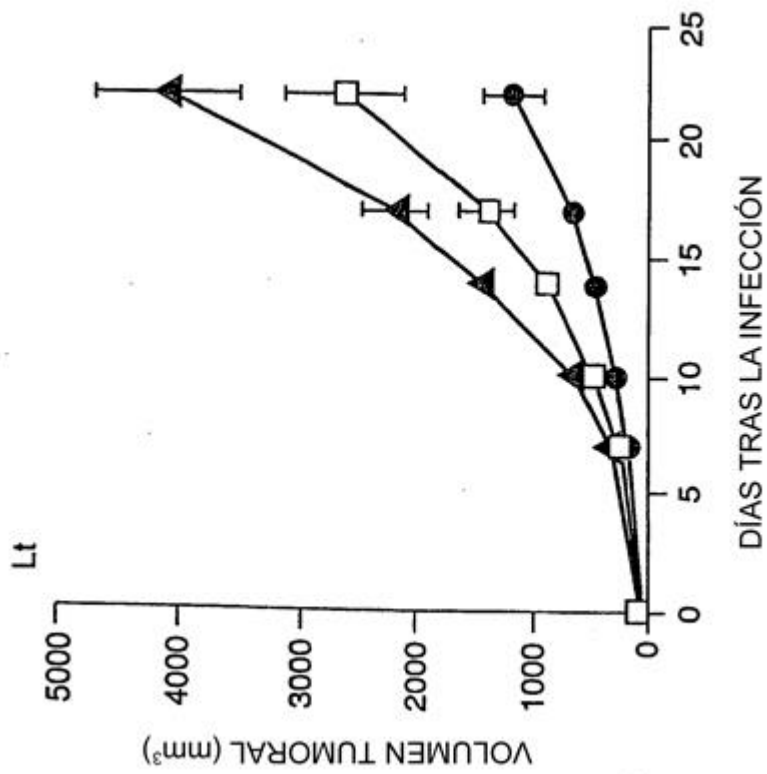


FIG. 9A

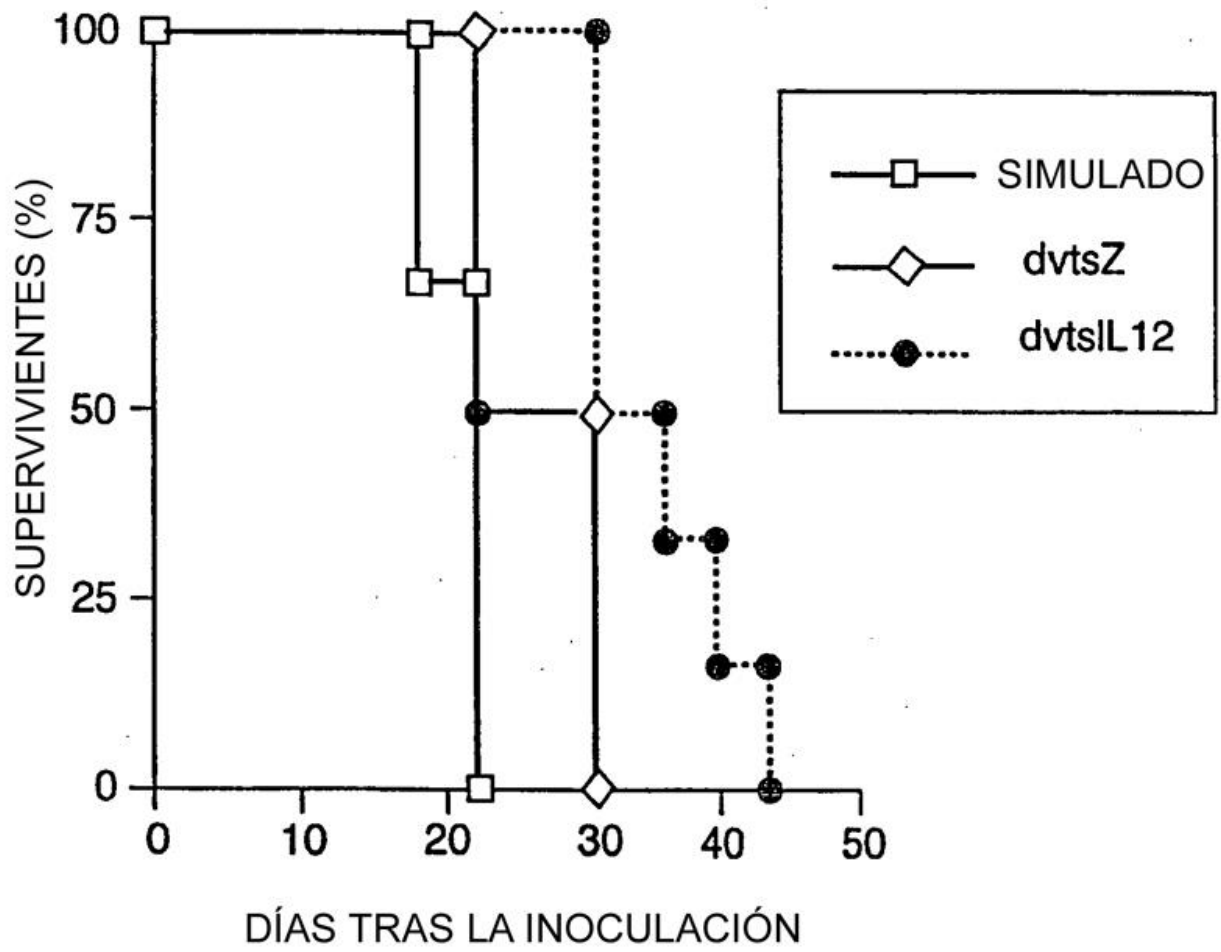


FIG. 10