15. PERSPECTIVAS EN TERAPIA GÉNICA DEL CÁNCER

Ramón Alemany y Santiago Ramón y Cajal

INTRODUCCIÓN

Por terapia génica, se entiende la utilización de métodos moleculares para reemplazar genes defectuosos o ausentes, para contrarrestar otros sobreexpresados, o para introducir alteraciones genéticas que pueden ser beneficiosas en el tratamiento de enfermedades. Este tipo de llevar a cabo la medicina, que parecía un asunto de ciencia ficción hace tan sólo unos años, es hoy en día una realidad completamente factible debido, entre otras cosas, al rápido progreso en las técnicas de DNA recombinante y de los procesos de transferencia genética, que se están llevando a cabo en numerosos grupos científicos con resultados bastante alentadores (2, 7, 33, 43).

Las primeras experiencias que podrían relacionarse con la terapia génica se remontan a 1944, cuando Avery et al estudiaron la transferencia génica mediada por DNA, de forma casual, al investigar las sustancias que transformaban los pneumococos. Hace 20 años se pudo incorporar DNA, mediante transporte intracelular mediado por fosfato cálcico en células en cultivo. Pero ha sido el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante lo que ha supuesto un avance espectacular y abierto enormes perspectivas en enfermedades de tipo genético como serían, por ejemplo, las hemoglobinopatías, el Síndrome de Lesch-Nyhan, el cáncer u otros procesos, que pueden tener un tratamiento molecular específico (2, 7)

CÁNCER. CONCEPTOS GENERALES

El cáncer, o el desarrollo de procesos tumorales malignos, es una de las causas más frecuentes de mortalidad, con unas perspectivas globales de curación del 50%. A nivel pronóstico y de perspectivas de curación, se podrá destacar el escaso avance clínico de curación de la mayoría de los tumores sólidos epiteliales, que son los más frecuentes, los cuáles mantienen unos porcentajes de curación equiparables a los de hace 15 años.

La formación de tumores humanos es muy compleja y requiere la acumulación de múltiples alteraciones oncogénicas (85, 15, 22, 29, 39). Dichas alteraciones moleculares van asociadas al desarrollo de los tumores, que en su inmensa mayoría muestran una progresión histopatológica desde lesiones incipientes, con grados de displasia y atipia variables, hacia tumores “benignos”, carcinomas intraepiteliales, tumores infiltrantes y, finalmente, con diseminación metastásica. La distinción entre benigno y maligno es simple, y conceptualmente errónea en muchos tumores y procesos neoplásicos. Es un error considerar a los tumores como procesos estáticos, que son definidos por una serie de características descritas en un momento dado y en un contexto anatomopatológico determinado. Desde el punto de vista molecular, el proceso carcinogénico se considera más dinámico y presumiblemente puede explicar la evolución frecuentemente impredecible de muchos procesos neoplásicos considerados benignos clínicamente (13).

La transformación maligna celular está relacionada con la activación de diversos oncogenes y a la inactivación de genes supresores. En dicho proceso de transformación celular va implícito el fallo de las células al diferenciarse (25, 38) y la activación de vías celulares que inducen proliferación. Dentro del complejo puzzle de alteraciones moleculares que pueden estar involucradas en el desarrollo de los tumores, es importante destacar la distinción de los genes gatekeepers (controladores del ciclo celular) y los carekeepers (controladores de la replicación fidedigna del ADN), propuesto por Vogelstein (25). De hecho, las células pueden tener sólo uno o algunos de estos genes inactivados, y que variarían según el tipo celular. Esta concepción de los genes reguladores, específicos de determinados tipos celulares, explicaría por qué mutaciones que se heredan por línea germinal sólo tengan efectos oncogénicos en determinadas localizaciones del organismo. Por ejemplo, el gen del retinoblastoma, el del von Hippel Lindau, el de la neurofibromatosis tipo 1 y el de la poliposis adenomatosa. En el caso de los genes reparadores, su importancia oncogénica sería indirecta, dado que no intervienen en la promoción tumoral inicial de las células, sino que al fallar la reparación de genes se induciría inestabilidad genética, con acumulación de mutaciones a lo largo del genoma, incluyendo los gatekeepers genes. Genes “reparadores” conocidos hasta la fecha incluirían los del xeroderma pigmentosum, el cáncer de colon familiar no asociado a poliposis, la ataxia telangiectasia y, probablemente, también los genes del BRCA1 y BRCA2 de predisposición al cáncer de mama.

No obstante, es importante resumir algunas consideraciones generales relacionadas con los mecanismos de carcinogénesis y de transformación celular, para poder entender mejor su aplicabilidad clínica en las vertientes de diagnóstico, pronóstico y de tratamiento.

- a) La descripción de oncogenes y genes supresores se basa en la capacidad transformante que confieren los oncogenes, y la pérdida de función de la actividad supresora de los genes supresores. Es importante resaltar que hay más de 100 oncogenes con capacidad transformante *in vitro*, y que la mayoría de los genes relacionados con el ciclo celular, la proliferación celular, los factores de crecimiento, así como con las múltiples rutas de transmisión de señales, involucran a genes cuya pérdida de control o con actividad constitutiva pueden asociarse a dicha ventaja de crecimiento que finalmente confiere la actividad transformante. No obstante, es importante saber que los criterios para calificar a una determinada alteración molecular como oncogénica son experimentales, y que se basan en que las células con un oncogén activado pueden crecer indefinidamente en cultivo, incluso en condiciones de bajo suero, que pueden formar colonias en “soft agar”, y que en determinadas situaciones pueden formar tumores tras su inyección en ratones atómicos. Dichos criterios y su relación con el concepto de malignidad clínica no son equiparables. Cada vez se describen con más frecuencia mutaciones y amplificaciones de oncogenes y delección de genes supresores en lesiones humanas no malignas, focos hiperplásicos, metaplasias, etc., es decir, no se puede hablar tampoco de malignidad de una lesión histológica basándose exclusivamente en las alteraciones moleculares. Ejemplos con mutaciones de ras y de p53 en lesiones reactivas y benignas de pulmón, laringe, colon, se están empezando a describir con asiduidad. Además, recientemente se ha descrito cómo el efecto transformante de oncogenes, como el ras, está relacionado con los niveles de expresión proteica e, incluso, en casos con mutaciones, no se han detectado niveles equiparables a los necesarios para conseguir un efecto transformante *in vitro*.
- b) Salvo algunos procesos hematopoyéticos, linfoproliferativos y tumores infantiles de células pequeñas, no hay alteraciones moleculares específicas de un determinado tumor (11). En este sentido habría que asumir que dentro del enorme número de alteraciones moleculares que pueden conllevar ventaja de crecimiento celular, los múltiples agentes carcinógenos (químicos, víricos y radiaciones) pueden elegir o activar indistintamente a varios de ellos y lo que, finalmente, lleve al desarrollo tumoral sea la acumulación complementaria de varias alteraciones oncogénicas, que contrarresten los controles fisiológicos de proliferación celular y los diversos factores mesenquimales e inmunológicos.
- c) Hay una enorme heterogeneidad y variabilidad en los tumores humanos, con más de 250 tipos diferentes o entidades anatomoclínicas, y casi ilimitados subtipos o variantes morfológicas. Dicha heterogeneidad tiene que ser el resultado de combinar dos variables. Una variable son los diversos tipos celulares de origen (en principio cualquier célula del organismo) y la otra, el elevadísimo número de alteraciones moleculares que puede acumularse en el proceso transformante.

A nivel molecular, se puede demostrar la variabilidad morfológica en función de diversos oncogenes y alteraciones oncogénicas presentes en las células (40, 41).

Asimismo, la evolución biológica, la respuesta inmune y la resistencia a los agentes químico y radioterápicos también se correlacionan con los numerosos genes involucrados en la carcinogénesis. Hay ejemplos claros de como las mismas células pueden formar lesiones mínimas en ratones singénicos y, por el contrario, tumores muy agresivos en ratones inmunodeprimidos. Asimismo, la capacidad transformante de los diversos oncogenes, en el sentido de agresividad tumoral y biológica, no es la misma para los diversos oncogenes, habiendo ejemplos de transformación a partir de las mismas células en las que algunos oncogenes inducen tumores de crecimiento lento y bien diferenciados, mientras otros se asocian a tumores agresivos y muy infiltrativos. Además, no todas las alteraciones oncogénicas descritas se asocian a un peor pronóstico de los tumores. De hecho, la sobreexpresión de *bcl2* se asocia a mejor pronóstico en cáncer de mama y de pulmón, e incluso determinadas alteraciones moleculares, como las mutaciones del *BRCA2* de cáncer de mama, se pueden asociar a mayor radiosensibilidad del tumor. Por tanto, la detección de algunas alteraciones moleculares puede ser un factor pronóstico favorable y orientar algún tipo de tratamiento más específico.

- d) En el propio concepto de tumorigenicidad va implícita la impredecibilidad de su evolución biológica. Los procesos tumorales van acumulando, durante su desarrollo, numerosas alteraciones moleculares. Esto es un hecho incontrovertible, que hoy en día se tiende a explicar tanto por la propia dinámica del proceso carcinogénico como por la presencia de diversas alteraciones moleculares, que favorecen la acumulación de múltiples errores genéticos en las células. Por ejemplo, por el fallo de los genes involucrados en la reparación del DNA y con las mutaciones de *p53*.

PERSPECTIVAS EN TERAPIA ANTITUMORAL BASADAS EN LAS ALTERACIONES ONCOGÉNICAS

Las perspectivas terapéuticas en cáncer se entroncan con el avance del estudio de las alteraciones moleculares en los tumores malignos y con el desarrollo de métodos de inhibición/supresión de dichas alteraciones moleculares, en el caso de los oncogenes, o bien en la restitución de aquellos genes supresores “inactivados”. En este sentido hay diversas líneas de investigación, algunas ya en fase de ensayos clínicos entre las que podrían destacarse las siguientes (3, 8, 14, 16, 49, 53, 54, 55, 57):

- a) El estudio de inhibidores de la actividad oncogénica. En este sentido hay varios trabajos prometedores sobre inhibidores de vías enzimáticas involucradas en

su síntesis (e.j. la farnesil transferasa y los genes ras) o, por ejemplo, el uso de inhibidores específicos, como el inhibidor de tirosinquinasa K252 para la actividad del oncogen *trk*.

- b) La introducción de genes supresores que están ausentes o mutados en los tumores. Como se sabe, las mutaciones de genes supresores, especialmente del p53 y p16, son las alteraciones oncogénicas más frecuentes descritas hasta la fecha en cánceres humanos. El uso de diversos métodos para transferir dichos genes a las células malignas es una de las vías más prometedoras en terapia génica.
- c) La inhibición de la actividad oncogénica por moléculas antisense o secuencias de nucleótidos complementarios al mRNA de diversos oncogenes, que hibridan con dicho RNA y anulan su actividad y expresión celular. Dicha aproximación ya se está realizando en algunos casos, funciona bien *in vitro*, resulta muy cara *in vivo* e induce en general un efecto transitorio y dependiente.

Tanto los tumores sólidos, como las leucemias y linfomas, muestran una sobreexpresión en ciertos oncogenes, y la malignidad de estas células podría desaparecer impidiendo la expresión de estos genes mediante la administración de pequeños oligodeoxinucleótidos complementarios a los mRNAs y DNAs correspondientes. Estos oligonucleótidos son moléculas de DNA de banda simple, sintetizados *in vitro* y modificados químicamente en el grupo fosfodiéster para hacerlos resistentes a las nucleasas. Con un tamaño de 15-20 nucleótidos, se pueden introducir por difusión simple en las células de un organismo. El oligonucleótido actúa a nivel de mRNA, hibridando con la región complementaria por puentes de hidrógeno con las bases correspondientes. La formación del híbrido, preferentemente en la región 5' del mensajero, impide la traducción y síntesis de la proteína correspondiente.

El uso de moléculas antisentido para modificar la expresión génica varía en su eficacia según el estudio. Pero existen resultados preliminares de varios estudios clínicos que demostraron la seguridad y la eficacia de algunos de estos tratamientos con oligonucleótidos antisentido (ODNs), como por ejemplo la respuesta clínica observada en algunos pacientes con cáncer de ovario tratados con ODNs codificando para la proteína kinasa C. También algunos procesos hematológicos tratados con estos oligonucleótidos antisentido, dirigidos contra *bcr/abl* y *bcl-2*, han mostrado una prometedora respuesta clínica.

- d) Diseño de nuevos protocolos de quimio y radioterapia (31). En este apartado hay que distinguir, por una parte, el estudio de nuevos fármacos antitumorales, como el TAXOL, que tienen efectos más o menos efectivos y selectivos en algunos tumores, y el empleo de métodos moleculares para aumentar la eficiencia de la quimioterapia y radioterapia, como pueden ser la transferencia

de genes de resistencia a drogas MDR a células progenitoras de la médula ósea. De este modo se pueden incrementar las dosis de quimioterápicos a los pacientes sin efectos colaterales nocivos, como la mielosupresión y, por último, se podría destacar, también, la posibilidad de aplicar unos protocolos de quimioterapia y radioterapia más específicos para cada tumor y cada paciente, en función de las alteraciones oncogénicas concretas que tengan dichos tumores. De este modo, se sabe que la respuesta celular a los diversos fármacos antitumorales, que se da en la mayoría de los tumores, puede variar según las alteraciones oncogénicas presentes en las células tumorales. Señalar la quimiorresistencia inducida por los oncogenes ras y neu, por las mutaciones de p53, la relación entre mutaciones de raf y resistencia a radioterapia,... así como que algunas alteraciones oncogénicas inducen resistencia a determinados agentes antitumorales y sensibilidad a otros. En este sentido, es interesante la relación de la amplificación de neu con la respuesta a la quimioterapia (46, 47). Estudios in vitro han demostrado que aumenta la resistencia al cisplatino y metrotrexate y, sin embargo, estudios de series clínicas relacionan la sobreexpresión de neu con mejor respuesta a derivados como la doxorrubicina. Con estos trabajos se pretendería aplicar protocolos más selectivos de quimioterapia y radioterapia a cada tumor, para aumentar la respuesta tumoral y también evitar situaciones de resistencia celular que puede conllevar o potenciar los efectos secundarios de las diversas drogas utilizadas (53).

PERSPECTIVAS EN TERAPIA ANTITUMORAL BASADAS EN MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

En los últimos años destacan las perspectivas de tratamiento antitumoral basadas en métodos y mecanismos inmunológicos (43, 44). Desde hace varios años se están desarrollando métodos biológicos y moleculares para potenciar el efecto citotóxico de los linfocitos T, bien por aislamiento y crecimiento in vitro y por transferencia de diversos genes como la IL-2 y TNF. Dicho abordaje, que se utiliza en algunos protocolos clínicos como en melanomas cutáneos, representa una línea prometedora dado que, teóricamente, pueden ser, además, complementarios de otros tratamientos y porque pueden permitir “matar” aquellas células diseminadas y resistentes a otros métodos clásicos. También se está intentando aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales transfiriéndoles genes como interleuquinas, el HLA-B7, y recientemente se está valorando el uso de vacunas antitumorales, haciendo híbridos de células tumorales y linfocitos B activados (con resultados muy prometedores) y otras con ciertos antígenos de oncogenes o versiones mutadas de la proteína p53. Finalmente, destacar algunas líneas de investigación muy prometedoras, pero de desarrollo muy incipiente, como puede ser el uso de péptidos miméticos de las regiones proteicas activas de determinados genes supresores como el p53, que puedan tener efecto supresor antitumoral.(57).

Los tumores malignos expresan antígenos capaces de actuar como estímulos y de servir como dianas ante la inmunidad antitumoral. El sistema inmune tiene el potencial de discriminar entre la forma normal y la aberrante. Por eso, los productos protéicos mutados de estos segmentos de DNA son inmunogénicos y pueden servir como antígenos, siendo de ese modo reconocidos por el sistema inmune del hospedador. A diferencia de la mayoría de las vacunas empleadas con los agentes infecciosos, la inmunoterapia antitumoral activaría la respuesta inmune contra ciertos antígenos, a los cuales ya ha sido expuesto el sistema inmune. Desde que comenzó el siglo, los científicos han estudiado las interacciones entre el sistema inmune y las células tumorales. En 1890, William Coley comenzó a tratar pacientes de cáncer con extractos bacterianos (toxinas de Coley) intentando activar la inmunidad sistémica del organismo y que, de este modo, parte de ella fuese dirigida contra el tumor. (36). Cien años después, el conocimiento de la inmunología a nivel molecular y de su regulación, permite el intento de crear vacunas antitumorales de mayor potencia y con mayor especificidad para las células tumorales a la primitiva de Coley, disminuyendo la toxicidad para las células normales.

Las estrategias usadas en la inmunoterapia del cáncer pueden ser divididas en activas y pasivas, por analogía a los términos usados en el tratamiento de enfermedades infecciosas. La inmunoterapia activa es la inmunización de pacientes con material diseñado para dar una respuesta capaz de eliminar o retardar el crecimiento tumoral. La inmunoterapia pasiva es la administración de anticuerpos que se unan a los antígenos de células tumorales. Además, estaría la inmunoterapia adoptiva, en la cuál se administran células linfoides activadas inmunológicamente.

La inmunización activa se puede realizar por diferentes métodos: a) Con citoquinas: Como IL-2 o IL-4 con las que se han realizado ensayos clínicos (45). En ellos se ha comprobado que existen efectos adversos muy tóxicos en humanos que no se habían visto en animales de experimentación. Por eso, al introducir altas dosis no fisiológicas de citoquinas, se obtendría una toxicidad muy elevada y que, además, no afectarían a los tumores. b) Con antígenos tumorales: La identificación de genes que codifican para péptidos de superficie celular en tumores, y que sean reconocidos por células Tc, han dado una base teórica para otra forma de inmunización activa.

Por los motivos anteriores, la vacunación con células presentadoras de antígeno que expresen proteínas y péptidos tumorales podrían mejorar la eficacia. Las células presentadoras de antígeno más poderosas inmunológicamente son las células dendríticas. Recientemente se han desarrollado nuevos métodos para aislar células dendríticas humanas de sangre periférica e, incluso, se ha iniciado un ensayo clínico

para evaluar la eficacia de células dendríticas autólogas, con idiotipos tumor-específicos, en el tratamiento del linfoma de células B (23).

Por otra parte, en el uso de anticuerpos administrados como inmunización pasiva, se han intentado también muchas variaciones. Una aproximación sería usar anticuerpos que se unan a antígenos en la superficie de las células tumorales para llevar agentes tóxicos al tumor y producir así una muerte selectiva. Los anticuerpos antitumorales, conjugados a moléculas tóxicas, radioisótopos y drogas, se han usado en ensayos clínicos en pacientes de cáncer y en animales de experimentación. Aunque esta estrategia parece conceptualmente perfecta, la aplicación práctica ha probado que es más difícil de lo que se pensaba.

Aunque algunos de los antígenos de superficie expresados por linfomas de células B, como CD19, CD20, CD22 y CD72, son unos blancos atractivos para la inmunoterapia mediada por anticuerpos, en recientes estudios un anticuerpo monoclonal CD20 marcado con iodo 131 fue usado para tratar pacientes con linfomas de células B, en los cuales la quimioterapia había fallado. De los 28 pacientes que recibieron una dosis, sólo 14 demostraron remisión completa durante más de 16 meses (26). Así, aunque los anticuerpos antitumorales penetren de manera muy pobre en los tumores, podría ser el mecanismo más efectivo en el tratamiento de enfermedades hematopoyéticas.

Finalmente, la inmunoterapia adoptiva de pacientes con cáncer puede ser dividida en 3 fases. La primera fase es separar los linfocitos autólogos del paciente de los del donante y el problema existente es que aún no se ha encontrado ningún procedimiento para separarlos en grandes cantidades.

La segunda fase es cultivar los linfocitos, y la tercera introducir las células efectoras antitumorales en el paciente. La infusión celular es, a menudo, administrada junto con grandes dosis de IL-2 en el paciente para promover la supervivencia y expansión de los linfocitos transferidos.

La experiencia clínica con este tipo de inmunoterapia ha demostrado que las células T sensibilizadas a antitumorales son potencialmente efectivas como agentes antitumorales por sí mismas. Pero, incluso en el tratamiento del melanoma, la mayoría de los pacientes no responden a la terapia y sólo unos pocos muestran una eliminación del tumor (44).

PERSPECTIVAS EN TERAPIA ANTITUMORAL BASADAS EN OTRAS ESTRATEGIAS

En los tumores hay múltiples alteraciones oncogénicas, sin que se conozca en la actualidad “el status jerárquico de las mismas y su importancia transformante”. Debido a la gran variabilidad de oncogenes y genes supresores que se van describiendo, y para evitar los problemas de la especificidad de los mismos y la teórica necesidad de aplicar múltiples terapias genéticas concretas, se están desarrollando métodos de terapia génica que tienen efectos citotóxicos genéricos. Dichos métodos se basan en la aplicación de genes suicidas, o genes que puedan inducir apoptosis en las células tumorales, y en una serie de estrategias dirigidas a inhibir la neovascularización de los tumores y la propagación de las células malignas (16, 36, 37). La formación de vasos sanguíneos es un requisito imprescindible en el desarrollo tumoral, además de constituir una barrera muy “impermeable” para agentes antitumorales y vectores virales, que se aplican en el tratamiento del cáncer. En este sentido, se han diseñado una serie de drogas que inhiben el crecimiento de células endoteliales vasculares, como la angiostatina y, asimismo, se están re-utilizando drogas, como la talidomida, que, por mecanismos desconocidos, inhiben la angiogénesis. De hecho, ya hay varios ensayos clínicos utilizando talidomida, en fase II en cánceres de cerebro, mama y próstata; y con interleuquina 12, en fase I, en cánceres de riñón y diversos inhibidores de metaloproteinasas, bloqueantes del calcio,...

Terapia antiangiogénica

Una de las características más notables de los tumores es la necesidad de proveerse de un suplemento sanguíneo a través del proceso de angiogénesis. Esto puede ser utilizado en muchos casos con usos terapéuticos, como en la terapia génica. La identificación de factores circulantes como la angiostatina o la endostatina que parecen capaces de suprimir la angiogénesis han despertado el interés de múltiples grupos para desarrollar y expresar estas moléculas recombinantes (8, 24, 37).

Terapia con genes suicidas o inductores de apoptosis

Los proyectos de terapia génica que se basan en reemplazar aquellos genes supresores defectivos o en la introducción de genes suicidas, o inductores de apoptosis, han dado lugar ya a numerosos protocolos y estudios experimentales. Destacan, especialmente, los que bien, mediante vectores retrovirales o adenovirales, intentan sobreexpresar p53 en las células tumorales e inducir apoptosis en las mismas. Asimismo, son muy prometedores los ensayos con **genes suicidas**, como el gen de la timidina quinasa, que, independientemente de las alteraciones

oncogénicas de las células tumorales, son capaces de inducir muerte celular en todas aquellas que los han integrado.

La transferencia de genes citotóxicos (llamados suicidas) a células tumorales es también conocida como GDEPT (Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy). Los genes suicidas son genes codificantes para proteínas tóxicas para la célula a la que se dirige. Esto se puede realizar, directamente, al utilizar genes que codifican para ciertas toxinas (ricina, toxina diftérica, de pseudomonas, etc.). El principal inconveniente de esta estrategia es elaborar virus que introduzcan este gen en la célula tumoral a destruir, únicamente. Actualmente se están intentando dirigir, mediante el uso de promotores específicos de algún tipo de tejido o inducibles (por hormonas, etc.).

También se puede realizar indirectamente (sistema enzima/tóxico condicional), ya que el gen suicida codifica para una enzima que pasa de un compuesto inactivo a una molécula tóxica. El ejemplo clásico de gen suicida es el de la quinasa de timidina de Herpes simplex (tk-HSV1). Esta enzima se encarga de fosforilar la timidina para dar deoxitimidin monofosfato (dMTP). La quinasa de Herpes no es tan estricta como su homóloga en las células, ya que la quinasa viral es casi 1000 veces más eficiente que la celular y sería capaz de fosforilar, también, a los análogos de guanina, como serían el ganciclovir o el aciclovir; de este modo, los compuestos pueden ser incorporados a la molécula de DNA, paralizando la replicación y provocando la muerte celular. Solo aquellas células que hayan sido capaces de adquirir la quinasa viral convertirán el GCV a un substrato monofosfato, capaz de seguir siendo fosforilado, hasta la forma trifosfato por la quinasa celular y así, en esa forma, puede ser incorporado en el DNA de las células en división, con la consiguiente muerte por apoptosis.

Una característica conocida de los retrovirus es que infectan exclusivamente células en división. El cerebro del adulto es uno de estos órganos en los que no hay divisiones celulares en condiciones normales. Tras unos experimentos iniciales, en los que se demostró el efecto tóxico del gen tk-HSV1 por Moolten en 1986, en 1991, Ezzedine y col., utilizaron un vector retroviral para generar una línea celular de glioblastoma que expresara la tk-HSV1. Posteriormente se demostró que la transducción retroviral de un tumor era mucho más eficaz por inyección directa intratumoral de una línea celular productora de retrovirus que si se inyectaban sólo sobrenadantes. Así, los retrovirus portadores del gen tk se introdujeron en células empaquetadoras murinas y éstas, a su vez, en el seno de un tumor cerebral. Al cabo de unos días se inicia el tratamiento con GCV, capaz de inducir el suicidio de todas las células tumorales que hayan adquirido el gen viral. En algunos ensayos clínicos se han tratado pacientes con gliomas inoperables. Mediante inyección estereotáxica se introdujeron retrovirus que expresan este gen directamente en el

tumor y, a continuación, se les dio a los pacientes GCV sistémico. En 5 de los 8 pacientes se observó repuesta antitumoral durante más de un año. El sistema tk-*HSV1*/GCV ha sido aplicado al tratamiento de otro tipo de tumores, como a metástasis del hígado, carcinoma de cabeza y cuello, melanoma maligno y hepatomas.

Otro sistema suicida, utilizado comúnmente en terapia génica, es el de la citosina deaminasa (CD)/5-fluorocitosina. La CD (bacteriana o fúngica), pasa del compuesto 5-fluorocitosina (usado normalmente como quimioterápico para el tratamiento del cáncer) al tóxico 5-fluorouracilo. Además, se está investigando otra serie de genes suicidas, como la tk de varicela zoster, fosforilasa de nucleósidos de purina de *E. Coli*, Citocromo P450, activador de la ciclofosfamida, nitroreductasa de *E.coli*. Una de las mayores ventajas que presenta esta aproximación está basada en lo que se conoce como el efecto bystander. Se entiende por tal al hecho de conseguir la regresión total de un tumor cuando sólo una parte de las células han sido modificadas con el gen en cuestión. De este modo, las células tk+ podían inducir la muerte de las células tk- adyacentes. Únicamente con el 10% de las células infectadas bastaría para observar grandes efectos en el tumor, inclusive con bajos niveles de expresión en éstas, lo cuál sin duda confiere un gran atractivo a este método.

Dianas transcripcionales

Entre las ventajas de los adenovirus está la capacidad de transducir células quiescentes y también en división. Asimismo, estos virus tienen un tropismo muy amplio que incluye la mayoría de carcinomas epiteliales, pero ésto no podría ser considerado como una ventaja por las razones explicadas anteriormente. En este contexto, el amplio tropismo de los adenovirus llegaría a ser una seria limitación

Entre los métodos que se podrían aplicar para dirigir el vector, estarían los métodos físicos (mediante la transducción *ex-vivo* de las células diana o la inyección intratumoral *in vivo*), pero sin duda los métodos más eficaces son la manipulación de la superficie del virus (50), o bien la incorporación de elementos capaces de regular la transcripción de manera que el virus sólo sea expresado en ciertos tipos de células.

Hasta el momento se han usado algunos promotores/enhancers para dirigir la expresión de toxinas genéticas en diferentes tipos de tumores. Una característica de la mayoría de los melanomas malignos es que expresan melanina y para su síntesis es esencial una enzima llamada tirosinasa. El tratamiento con un gen suicida bajo el promotor de la tirosinasa, produjo una disminución significativa del tumor (54). Otros abordajes similares son los que se han realizado con el promotor

de la α -fetoproteína para los hepatocarcinomas, las secuencias reguladoras del antígeno carcinoembrionario (CEA), que se usa para los carcinomas pulmonares y colorectales (42), o tumores gástricos, así como, en tumores prostáticos, el promotor del antígeno específico de próstata (28). Finalmente, otra estrategia a usar sería mediante contrucciones con el gen terapéutico bajo el control de un promotor que se active únicamente cuando existan ciertas alteraciones oncogénicas, como en el caso del gen hsp70, que es reprimido en células con p53 wt pero está sobre-expresado en muchas células tumorales con defectos en la función de p53. (57)

Aplicación de genes pro-apoptóticos

En este contexto de terapia génica, se puede considerar la aplicación del **GEN VIRAL E1A DE LOS ADENOVIRUS** (18, 19, 20, 33, 34, 51). Los adenovirus humanos presentan un genoma compuesto por una molécula de DNA de cadena doble de unos 35kbp aproximadamente (21). El gen E1A de adenovirus es capaz de inducir quimio y radiosensibilidad en diversos modelos experimentales, tanto murinos como humanos (31,32,46,47). Este efecto está mediado por su capacidad de unión a distintas proteínas celulares que son acomplejadas por la proteína E1A, tales como P105 (proteína de Rb), p107, p130, p300, YY1 y Dr1. Este gen ha sido relacionado, igualmente, con fenómenos de apoptosis en células tratadas con agentes antitumorales, al parecer a consecuencia de mecanismos independientes de la proteína p53, relacionados con su capacidad para unirse a las distintas proteínas celulares acomplejadas por E1A. Otras vías de señalización, tales como las controladas por los genes Bcl-2, Bcl-Xl o Bcl-Xs podrían estar involucradas. Además, la posibilidad de inducir quimio y radio sensibilidad por mecanismos independientes de la proteína p53 es claramente ventajosa frente a otros abordajes en los que esta proteína juega un papel fundamental, ya que aproximadamente un 50% de los tumores presentan alteraciones en la misma. Los diversos efectos de la proteína E1A se asocian al binding e inactivación de diversas proteínas celulares. De este modo, estudios previos han correlacionado la inducción de apoptosis con el binding al grupo de la proteína del retinoblastoma pRb y al grupo de la proteína p300. Para la inducción de quimio y radiosensibilidad se requiere también el binding a dichos grupos de proteínas celulares excepto para la inducción de sensibilidad a la doxorrubicina, que se asocia con el binding al grupo de la proteína p300. Asimismo, se sabe que la estabilización de la proteína p53 viene mediada por la región aminoterminal del E1A, y en concreto, a través del binding a la p300. Pero para que se produzcan la mayor parte de los efectos del E1A se requiere inactivación del grupo pRb y de la p300, y dicha complementariedad de acción puede solaparse in vivo en células con alteraciones previas de la fosforilación de la pRb. De hecho, estudios recientes apuntan que la expresión de mutantes de E1A que sólo se unen a la p300 pueden inducir un efecto E1A completo de apoptosis

y sensibilidad a quimioterápicos y radioterapia en células transformadas con defectos de la pRb. (Lowe, 1997)

Otro de los aspectos que convierten al gen E1A de adenovirus en un posible agente terapéutico es su capacidad supresora de tumores (19,32,35). Esta singular característica, dado que en algunos modelos murinos experimentales el citado gen ha sido asociado a la transformación, supondría que pueda ser considerado como un gen supresor de tumores. El mecanismo por el cuál E1A presenta efecto antioncogénico no está claro. Según algunos autores, se basa en la capacidad represora que presenta sobre la expresión del oncogén Neu/C-erb2. Este dato ha sido corroborado tanto en modelos experimentales como, por ejemplo, los fibroblastos murinos NIH 3T3, como “in vivo”, mediante tumores generados en ratones atómicos pertenecientes a la línea celular SVKO, utilizando en este caso vectores adenovirales o por lipofección. No obstante, existen evidencias experimentales en las que se demuestra la capacidad supresora del gen E1A sobre tumores de líneas celulares tales como Hela (Carcinoma de cervix) y Saos-2 (osteosarcoma), sin implicaciones sobre la expresión de Neu, originándose vías alternativas del efecto supresor de E1A. En cualquier caso, el gen E1A, sin efecto transformante “per se”, presenta la habilidad de bloquear la formación y desarrollo de diversos tipos de tumores. Igualmente, E1A ha sido asociado a supresión de metástasis, si bien este efecto parece depender del tipo celular en estudio.

Asimismo, es muy relevante e interesante la demostración, por el grupo de McCormick, que adenovirus defectivos de la región E1B, que codifica para la proteína 55K E1B, puedan replicarse selectivamente en células con pérdida de función de la proteína p53 (58,59). Dicha hipótesis, y resultados preliminares, han abierto un nuevo camino de investigación oncológica, en el que se trata de aprovechar las alteraciones moleculares oncogénicas de las células para diseñar vectores virales más selectivos de replicación. En dicho sentido, el vector adenoviral que nosotros estamos valorando tiene también ausencia de la proteína 19K E1B (inhibidor de apoptosis, de alta homología funcional con el bcl2), con lo cuál dicho vector puede aprovecharse de las ventajas de crecimiento más selectivo en células con pérdida de función de p53 (por ausencia de la 55K E1B) y tener una alta expresión de proteína E1A (62).

En esta línea de razonamiento, nosotros pretendemos, también, estudiar vectores adenovirales a los que se les ha deleccionado toda la región E1A y se les han insertado mutantes del gen E1A (61). Dicho abordaje, semejante al que hemos utilizado desde hace varios años con los vectores retrovirales, puede permitirnos delinear más nítidamente qué regiones del gen E1A y, por consiguiente, qué proteínas celulares son las que se necesita inhibir para inducir el efecto antitumoral. Además, este abordaje, con mutantes del gen E1A insertados en vectores adeno-

virales, nos permitirá limitar mucho más el efecto citotóxico de la infección adenoviral a células malignas/transformadas. De hecho, aquellos mutantes de E1A (porción aminoterminal, de unión a la p300) sólo inducirán, presumiblemente, efectos citotóxicos y quimiosensibilidad en células humanas con inactivación previa de la proteína del retinoblastoma. Como es bien conocido, el fallo en el control de la fosforilación de la pRb es una de las alteraciones oncogénicas más frecuentes en tumores humanos. Dicha alteración puede venir mediada tanto por mutaciones/delecciones del gen pRb, como por la inactivación de alguno de los diversos genes supresores de las quinasas dependientes del ciclo celular y complejos ciclinas/CDK, que controlan el ciclo celular. Tanto la pérdida de función de p16, p21waf1, p27, p53 (a través de p21), van a condicionar que la pRb se fosforile y, por consiguiente, que se libere el factor de transcripción E2F, y siga el ciclo celular. Por tanto, aproximaciones de terapia génica que sean especialmente efectivas en células con alteración del control del ciclo celular son muy prometedoras.

Principales vectores en terapia génica antitumoral

Los vehículos de transferencia de material genético se clasifican en virales o no virales, según deriven de virus o no. Los vectores no virales son menos eficientes, pero menos tóxicos y más fáciles de producir. Se preparan, simplemente, mezclando el ADN con polímeros, lípidos y proteínas, que envuelven y protegen el ADN contra las nucleasas extracelulares. Los más utilizados son los liposomas, compuestos por fosfolípidos bipolares que forman bicapas que envuelven el ADN. Otros vectores no virales están compuestos por policationes de carga positiva, como la polilisina y la polietilenimina. Estos vectores son apropiados en estrategias que en principio no requieren una eficiencia de transducción muy elevada, o que van dirigidas hacia la modificación de células normales, como en inmunoterapia y antiangiogénesis. En inmunoterapia para inducir una respuesta inmune no es necesario transducir cada célula tumoral y, por otro lado, la existencia de antígenos derivados de virus parece enmascarar la respuesta contra antígenos tumorales. Otra ventaja de los vectores no virales, como los liposomas es que se han optimizado para el transporte de drogas, como doxiciplina a tumores y se usan habitualmente en oncología (63). Cuando el objetivo principal es eliminar las células tumorales y se requiere una elevada eficiencia de transducción, los vectores virales son actualmente más apropiados. Éstos se generan y propagan en líneas celulares que proveen todos los genes virales que han sido delecionados en el vector. Puesto que el objetivo principal es eliminar las células tumorales, no se requiere la expresión permanente del transgén. Así, los vectores que integran el material genético en la célula diana, como los retrovirus y los parvovirus adeno-asociados, no suelen emplearse. Los retrovirus, sin embargo, fueron los vectores que abrieron el campo de la terapia génica del cáncer (64). Estos virus presentan una envuelta

lipídica que rodea la cápside proteica que contiene el material genético en forma de ARN. En células en división, este ARN llega al núcleo y se copia a ADN para integrarse en el genoma celular. Se consideró que esta dependencia de la división celular era una característica ventajosa para transducir selectivamente células tumorales. Sin embargo se ha visto que en los tumores de pacientes el número de células en división activa en un momento dado es muy bajo (menor del 10%), por lo que la transducción de tumores con vectores retrovirales es muy limitada. Otra limitación de los retrovirus es su inestabilidad en el torrente circulatorio y las bajas concentraciones obtenidas en su purificación a partir del sobrenadante de la línea empaquetadora. Retrovirus del tipo lentivirus, como el virus del SIDA, no requieren división celular para transducir pero su capacidad de transducir, tumores *in vivo* todavía es muy baja. En contraposición a los retrovirus, los vectores derivados de adenovirus presentan características de estabilidad en fluidos corporales, expresión transitoria y eficiencia de transducción superiores a cualquier otro vector viral y no viral.

Vectores adenovirales

En 1953, Rowe y colaboradores descubrieron un nuevo agente citopático no filtrable en cultivos de ganglios adenoides (65). Pronto se descubrió que el denominado adenovirus era responsable del 5% de los resfriados agudos en niños, que pueden ir acompañados de faringitis y conjuntivitis. Hasta el momento se han caracterizado más de 49 tipos distintos de adenovirus humanos. Los serotipos 2 y 5, de los cuales se han derivado los vectores para terapia génica, causan resfriados infantiles poco virulentos, en su mayoría asintomáticos, de modo que el 80% de los adultos son seropositivos. Su estructura y ciclo vital son bien conocidos. El adenovirus está formado por una cápside proteica icosaédrica, sin envuelta lipídica, de unos 80 nm de diámetro. De sus vértices sobresale una proteína, a modo de antena, llamada fibra, que interacciona con el receptor celular presente en la mayoría de células de origen epitelial llamado receptor de coxsackie-adenovirus (CAR). En la base de la fibra existe otra proteína llamada base del pentón que se une a integrinas para facilitar la internalización del virus. Las paredes de la cápside están compuestas mayoritariamente por la proteína llamada hexón y encierran un ADN lineal de doble hélice de 36 kilobases. Después de unirse a CAR y a las integrinas, el virión entra por endocitosis al interior de un endosoma celular. A pH ácido, el virus es capaz de destruir el endosoma para ganar acceso a la membrana nuclear e inyectar su ADN al núcleo. Los primeros genes virales que se expresan son los llamados tempranos (que de izquierda a derecha se denominan “early” 1, 2, 3 y 4). E1 y E4 codifican para proteínas reguladoras que inducen el ciclo celular y regulan la expresión de los demás genes virales. La inducción forzada del ciclo celular es detectada por la célula infectada, que responde activando su muerte celular programada o apoptosis. E1 también se encarga de inhibir esta

apoptosis. E2 codifica proteínas implicadas en la replicación del ADN viral. E3 codifica proteínas que evitan la respuesta antiviral del huésped. El origen de replicación del ADN viral se localiza en unas secuencias de 103 pares de bases, que se repiten en sus extremos, llamadas ITRs. Con la replicación viral se activa la expresión de las proteínas tardías que forman nuevas cápsides. Las cápsides empaquetan el ADN viral mediante el reconocimiento de una señal de empaquetamiento que éste contiene anexa a la repetición terminal izquierda. Cuando más de 10.000 nuevos viriones se han formado en el núcleo de la célula infectada, ésta se lisa y los libera.

A principios de los 80, después de una década de experiencia en la manipulación genética de plásmidos y virus bacteriófagos, varios virus de ADN, como el SV40, el virus de la vacuna (vaccinia) y el adenovirus, se modificaron para conseguir expresión de proteínas en eucariotas. Los primeros adenovectores contenían el transgén clonado en un genoma viral parcialmente deleccionado. Estos vectores necesitaban de un adenovirus intacto para propagarse, de modo que las preparaciones de vector contenían el vector y el virus adyuvante o “helper”. Gracias a la construcción de líneas celulares que expresan proteínas virales, los vectores posteriores se pueden propagar sin helper. La primera línea celular producida fue la línea 293. Ésta expresa los genes E1, por lo que permite la propagación de vectores deleccionados en E1, llamados de primera generación. Nuevas líneas celulares que expresan E1, E2a y E4 permiten la propagación de vectores deleccionados en estas regiones, llamados de segunda generación (66). La región E3 es necesaria para evitar respuestas inmunes antiadenovirales, pero puede ser deleccionada si la inmunogenicidad del vector no es un problema. La presencia de genes virales en el vector da lugar a la producción de proteína viral en cantidades pequeñas pero suficientes para que linfocitos citotóxicos sean capaces de eliminar las células transducidas (67). Este problema ha impedido el éxito de los vectores adenovirales en enfermedades genéticas no malignas, donde se requiere la transferencia permanente del transgén. En este caso se hace necesario usar vectores que contengan sólo la señal de empaquetamiento y las secuencias terminales necesarias para la replicación, pero deleccionados de todos los genes virales (68). Estos vectores, llamados miniAd o ‘gutless’, dependen todavía de helper, pues no se ha conseguido una línea empaquetadora que exprese todos los genes virales. En terapia génica del cáncer, puesto que el requisito de expresión permanente no existe, se utilizan normalmente los vectores de primera generación. Estos vectores pueden transportar hasta 8 kilobases de ADN exógeno insertado en la regiones E1 o E3. Su purificación por gradientes de cloruro de cesio o sucrosa, o en columnas de cromatografía, permite concentrar el virus hasta títulos de 10¹³ viriones por mililitro. Además de este título físico, se mide la cantidad de viriones que son activos, en base a su capacidad de transferir el gen o de formar

una calva de lisis, o placa, en una monocapa de células 293. Del 1 al 10% de los viriones suelen ser activos, ya sea como unidades de transferencia génica (TU) o como unidades formadoras de placa (PFU). Un problema identificado al propagar estos vectores en la línea celular 293 es la generación de adenovirus competentes para replicarse en células sin E1 (llamados adenovirus de replicación competente, RCA) a raíz de una recombinación entre el genoma viral y la región E1 insertada en el genoma celular. Esto se debe a que 293 contiene secuencias virales más allá de la región E1 presentes también en el vector. El uso de líneas celulares como A549-E1 o PER-C6 con la región E1 bien acotada permite la propagación de vectores delecionados en E1 sin la generación de RCA (69). Puesto que el vector es inmunogénico, debido a la presencia de genes virales, su uso queda restringido a la inyección directa de virus en el tumor, o en cavidades que confinan el tumor (cavidad quirúrgica después de una operación, intrapleural para mesotelioma, intraperitoneal para carcinomas de ovario e intravesical para carcinoma de vejiga). Cuando se ha administrado sistémicamente, se ha observado que la transducción de hepatocitos conlleva una respuesta inflamatoria limitante, que puede ser grave a dosis por encima de 10¹³ viriones. La modificación de la cápside viral para conseguir la transducción selectiva de las células tumorales quizás permitirá la utilización de vectores por vía intravascular.

Los principales adenovectores antitumorales que han llegado a la clínica han sido los de transferencia de genes de la timidina quinasa, p53 e IL-2. En cada caso la eficacia antitumoral en modelos animales ha resultado muy prometedora, pero en ensayos clínicos los resultados han sido más bien decepcionantes. La administración intrapleural de hasta 10¹² PFU de Ad-TK para tratar mesoteliomas es bien tolerada, y el gen se transfiere, incluso, en presencia de respuesta inmune antiviral, pero la respuesta clínica es nula, pues el vector sólo alcanza la capa más superficial del tumor (70). Resultados similares se han obtenido en carcinomas de próstata (71). La transferencia de p53 con adenovirus demuestra la capacidad selectiva de p53 de inducir apoptosis en tumores inyectados. La inyección de Ad-p53 en carcinomas localizados avanzados de pulmón, de célula no pequeña, es capaz de controlar temporalmente el tamaño de los tumores (72). Su remisión parcial se consigue combinando Ad-p53 con cisplatino (73). En un ensayo clínico en tumores de cabeza y cuello, Ad-p53 ha producido regresiones ocasionales de más del 50% del tamaño tumoral (2 de 17 pacientes evaluables) (74). Cuando se utiliza como terapia adyuvante en la cavidad quirúrgica postoperatoria, los resultados son mucho más obvios, sin poderse detectar enfermedad a los 18 meses en un 25% de los pacientes tratados, teóricamente incurables. Ad-IL-2 inyectado, en neuroblastomas se acompaña de respuestas inmunes antitumorales (75). En melanomas y en carcinomas de mama, Ad-IL-2 produce regresiones en nódulos inyectados, pero no en los no inyectados del mismo paciente, lo que en realidad

indica la falta de inmunidad antitumoral (76) (los mejores resultados con IL-2 y IL-12 se han obtenido con vectores no virales, con un porcentaje de respuesta en melanomas y carcinomas renales del 10%). Para mejorar los resultados obtenidos, es preciso conseguir vectores capaces de transducir un mayor número de células tumorales. Además, si se pretende tratar tumores diseminados, los vectores también han de poder ser administrados sistémicamente para que alcancen focos tumorales sin afectar a los tejidos normales. En la siguiente sección se describe cómo los adenovirus están siendo modificados para adquirir estas propiedades.

Adenovectores dirigidos

En mayor o menor grado, el receptor natural del adenovirus CAR se expresa en multitud de tipos celulares, incluyendo hepatocitos, células endoteliales y células efectoras del sistema inmune. Si administramos el vector en el torrente circulatorio, además de adsorber virus, estas células responden a la interacción con el virus secretando mediadores inflamatorios. Sobre todo, la hepatotoxicidad causada por la transducción hepática limita el uso endovenoso de adenovectores. Por otro lado, el tumor puede carecer del receptor CAR y ser refractario a la transducción con adenovectores. Por ello, cambiar el tropismo del adenovirus hacia receptores expresados selectivamente en tumores, ha sido un área central de investigación en terapia génica antitumoral (77).

Se han utilizado dos estrategias para construir adenovectores dirigidos. La primera consiste en acomplejar el virus con una molécula bifuncional, que reconoce la fibra del virus, por un lado, y el receptor diana, por otro. Por ejemplo, un complejo formado por un anticuerpo que reconoce la fibra y el factor de crecimiento de fibroblastos FGF es capaz de redirigir el vector adenoviral hacia tumores que expresan el receptor de FGF. Puesto que la unión de ligandos a receptores es parte de un equilibrio dinámico, la estabilidad del complejo en el torrente sanguíneo es baja. Además, el aumento de tamaño del vector acomplejado puede suponer una mayor retención en los capilares pulmonares y una menor extravasación y penetración en tumores. La segunda estrategia está basada en la modificación genética de la cápside del vector, de modo que la secuencia de un nuevo ligando se introduce en una proteína de la cápside viral. Hasta el momento, se han insertado pequeños ligandos en el extremo C-terminal y el asa HI de la fibra, así como en la región hipervariable 5 del hexón. Si no se deleccionan los residuos aminoacídicos de la fibra responsable de unir CAR, entonces obtenemos un vector de tropismo expandido pues es capaz de unirse a tumores vía CAR y vía el nuevo receptor. Si se elimina la unión a CAR, entonces obtenemos un vector redirigido, exclusivamente, al nuevo receptor. Esta estrategia no resulta en el aumento del tamaño de la cápside, y produce un vector con ligando unido de forma estable que es más fácil de producir y formular. Además, si el vector se replica, como se describe

más adelante, su progenie sigue conteniendo el ligando en la cápside. Hasta ahora se han utilizado ligandos como polilisina, que se une al receptor de heparan sulfato, o el tripéptido RGD, que se une a las integrinas para aumentar la transducción de tumores (78). La limitación principal de esta estrategia es el pequeño tamaño (menos de 20 residuos) de los ligandos que se pueden incorporar en la fibra o el hexón, sin afectar su ensamblaje en la cápside. El cribaje de librerías de fagos para el aislamiento de péptidos que se unen específicamente a tumores, o a vasculatura tumoral, ha ofrecido una serie de péptidos que pueden ser utilizados (79). Lo ideal, sin embargo, sería incorporar ligandos, como anticuerpos de cadena única, (el fragmento variable que reconoce un antígeno) cuya afinidad es mayor y su uso para dirigir drogas a tumores ya es una realidad clínica.

Otro problema complementario al dirigir el vector a la célula tumoral diana es evitar su unión a otros tipos celulares (80). Hemos mencionado que para ello es necesario deleccionar los residuos de unión a CAR. Sin embargo, parece que eliminar sólo la unión a CAR no es suficiente para evitar que el vector sea adsorbido por varios tipos celulares. La eliminación de la secuencia RGD, presente en la base del pentón de la cápside viral responsable de la unión a integrinas, también es imprescindible. El principal problema parece ser independiente de CAR e integrinas. Si se inyectan adenovirus o vectores adenovirales por vía endovenosa, la gran mayoría de partículas son ingeridas rápidamente por los macrófagos del hígado y del bazo. La unión del virus a estas células parece no ser mediada por CAR o integrinas. Parece que simples fenómenos asociados a la carga negativa de la cápside podrían ser responsables de la unión a macrófagos, en cuyo caso sería necesaria la deleción de residuos acídicos de la cápside. Todavía se desconocen los mecanismos por los cuáles el adenovirus es eliminado tan rápidamente de la circulación sanguínea, pero, si pretendemos utilizar este vector para el tratamiento sistémico de tumores diseminados o metástasis, será preciso mejorar su farmacodinámica. En el caso de los liposomas, este problema se ha solventado recubriendo el liposoma con el polímero neutro polietilenglicol (PEG) (63). De modo similar, la pegilación de adenovirus aumenta su permanencia en sangre (81).

Terapia viral y vectores condicionalmente replicativos

En el apartado anterior hemos comentado las propiedades de permanencia en sangre e infección dirigida que debería poseer un vector adenoviral ideal. En principio, un vector que no es ingerido por macrófagos y que tiene una cápside que interacciona tan sólo con células tumorales, se localizaría progresivamente en el tumor, debido en parte a la estructura más desorganizada de los vasos sanguíneos en los tumores, lo que permite una extravasación mayor. En ningún caso se espera que el nivel de vector que llegue a un tumor por vía endovenosa se equipare con los niveles ya conseguidos por inyección intratumoral. Pero sabemos que, ni

siquiera los niveles conseguidos por inyección intratumoral, son suficientes para eliminar tumores. Esta limitación ha llevado recientemente a considerar el uso de vectores que se replican de manera específica en el tumor. La amplificación de los efectos citopáticos del vector a través de todo el tumor podría compensar la transducción insuficiente. Los agentes de replicación competente más sencillos son los virus. La idea de utilizar virus para el tratamiento del cáncer data de principios de siglo, cuando se observaron regresiones de tumores de pacientes que sufrían infecciones virales (82). Casi cada virus se ha inoculado en tumores de pacientes tan pronto como se ha descubierto: el virus de la vacuna, el de la rabia, el de la enfermedad de Newcastle, Bunyamwera, West Nile, Herpes simple, varicela, paperas, sarampión, estomatitis vesicular, y otros. El mismo adenovirus se utilizó para el tratamiento de carcinomas cervicales tres años después de su identificación (83). En general la viroterapia ha sido abandonada en cada caso por falta de resultados convincentes. Cuando la limitación no ha sido la toxicidad del virus, la regresión inicial que ocurre después de la inyección se ha visto neutralizada por la respuesta antiviral. En pocos casos se ha conseguido la eliminación completa del tumor. Existen algunas excepciones que todavía no han sido descartadas para su uso terapéutico. Virus que dependen de un ciclo celular activo, como los parvovirus, o de una vía de transducción de señal activa, como la de *ras* en el caso de reovirus, presentan un oncotropismo natural muy atractivo. Por otro lado, el oncotropismo se puede conseguir por manipulación genética, estrategia que se está aplicando actualmente al virus herpes simplex (HSV-1) y al adenovirus. Ambos son virus de ADN que se replican en el núcleo de la célula infectada y que interactúan con proteínas nucleares frecuentemente alteradas en la transformación maligna. Por ello, estos virus son idóneos para aprovechar las diferencias moleculares entre células normales y malignas, responsables de la génesis tumoral, y que no se reflejan en la membrana celular. El HSV-1 es un virus con envuelta lipídica con un ADN de doble cadena de 152 kb. Para su replicación en células quiescentes, el HSV necesita del gen de la ribonucleótido reductasa y del gen de neurovirulencia $\gamma_{34.5}$. Un HSV mutado en estos genes infecta selectivamente células en división y está siendo utilizado en ensayos clínicos contra glioblastomas (84). En el caso del adenovirus se han utilizado dos estrategias para conseguir replicación selectiva en tumores: el control de genes virales con promotores activos en tumores y la delección de funciones dispensables en tumores (85).

Los primeros genes virales que se expresan cuando el genoma viral llega al núcleo de la célula infectada son los de la región E1a, cuyas proteínas controlan la expresión del resto de genes virales. Por ello, para conseguir replicación selectiva en tumores, se ha insertado un promotor exógeno delante de E1a. Los promotores utilizados pertenecen a genes expresados selectivamente en tumores como los correspondientes a proteínas oncofetales (alfa-fetoproteína y el antígeno carcino-

embrionario) (86). Otros promotores pertenecen a genes expresados en el tejido del cual proviene el tumor, como el promotor del gen del antígeno específico de próstata (PSA) (87). En cada caso, el adenovirus construido ha mostrado cierta especificidad *in vitro*, replicándose sólo en las células tumorales donde el promotor que regula E1a es activo. Sin embargo, se ha visto que varios promotores pierden su regulación al ser insertados en el genoma adenoviral y es necesario insertar secuencias de ADN aislantes para mantener su fidelidad (88). Por otro lado, los vectores replicativos que no presentan delecciones de genes virales sólo permiten la inserción de 2 kb de ADN exógeno y muchos promotores superan ese tamaño. Esta limitación se ha resuelto empleando dos vectores que se complementan mutuamente (86).

Hemos mencionado que, para replicarse, el adenovirus necesita inducir el ciclo celular y evitar la apoptosis de la célula infectada. Estas funciones recaen, principalmente en el dominio de unión a Rb de E1a, y en el dominio de unión a p53 de E1b-55K. En células normales, Rb detiene el ciclo celular al secuestrar el factor de transcripción E2F, que es responsable de activar la síntesis de proteínas implicadas en la división celular. En el ciclo celular normal, las quinasas dependientes de ciclinas fosforilan Rb para liberar E2F. P53 también controla el ciclo celular al inhibir estas quinasas dependientes de ciclinas. Otra función de P53 es la de activar la apoptosis cuando el ciclo celular se ve activado de forma anómala, como en el caso de una infección adenoviral. En células infectadas por adenovirus, E1a secuestra Rb y E1b-55K se une e inactiva p53 para inducir el ciclo celular y evitar la apoptosis. La inactivación de Rb y P53 juega un papel fundamental en la génesis de numerosos tumores. En teoría, un adenovirus que infecte dichos tumores no necesita inactivar Rb y p53. De este modo, un adenovirus deleccionado en el dominio de unión a Rb de E1a, o en E1b-55K se propagaría eficientemente en células tumorales sin Rb o sin P53, pero en células normales no podría inducir el ciclo celular o evitar la apoptosis. Estos virus ya se han construido y se ha estudiado su especificidad. Así, se ha comprobado que un adenovirus deleccionado en E1b-55K, llamado Onyx-015, lisa selectivamente células sin p53 (89). Esta correlación entre la replicación de Onyx-015 y la ausencia de p53 no siempre se mantiene, pues otras funciones de E1b-55K, además de la inactivación de p53, también son importantes para la replicación viral. En ensayos clínicos, Onyx-015 es eficaz, sobre todo cuando se combina con quimioterapia con 5-fluorouracilo. En tumores recurrentes de cabeza y cuello, la inyección intratumoral de Onyx-015 resulta en un 27% de remisiones completas y un 36% de ausencias de progresión. El hecho de que Onyx-015 sea eficaz al combinarse con quimioterapia parece deberse a que la expresión del gen E1a sensibiliza las células tumorales a los efectos tóxicos de varias drogas (46). Por otro lado, también se ha construido un adenovirus donde se ha deleccionado el dominio de unión a Rb de E1a (90). Este

virus, llamado AdD24, se replica selectivamente en células con un ciclo celular activo. Cuando la función de Rb se restablece para detener el ciclo celular, AdD24 no es capaz de replicarse. Si bien estrictamente Onyx-015 y AdD24 no son vectores, pues no transportan ningún gen exógeno, genes como la quinasa de timidina se han insertado en Onyx-015 para así generar un vector selectivamente replicativo, en donde oncolisis y terapia génica se combinan, aumentando la eficacia de estas dos estrategias por separado. Otro paso en la combinación de estrategias para mejorar la eficacia antitumoral de los vectores adenovirales ha sido la inserción de ligandos para dirigir el vector adenoviral en adenovirus de replicación selectiva (91).

La limitación principal que podrían presentar los adenovirus oncolíticos es la neutralización por anticuerpos antivirales. El adenovirus humano no se propaga en células de otras especies, por lo que los estudios preclínicos se realizan en ratones inmunodeficientes, en los que se han xenoinjertado células tumorales humanas. La falta de modelos inmunocompetentes impide evaluar el efecto de la respuesta inmune en la oncolisis. De momento, en los ensayos clínicos con Onyx-015 no se han encontrado diferencias entre pacientes con anticuerpos antiadenovirales o sin ellos (92). Incluso, en pacientes donde la inyección inicial del virus conlleva la producción de elevados títulos de anticuerpos neutralizantes, se observan respuestas antitumorales a inyecciones posteriores del virus. Parece que la penetración de los anticuerpos en los tumores no es suficiente como para neutralizar la propagación local del virus. Si es así, la estructura del tumor va a determinar la eficacia de esta terapia. En tumores donde la respuesta inmune humoral pueda neutralizar la oncolisis, el adenovirus oncolítico puede ser diseñado para expresar citoquinas como IL-12, que modulan la respuesta inmune inhibiendo la producción de anticuerpos(93).

Conclusión

Existen numerosas estrategias en terapia génica contra el cáncer, pero la eficacia de muchos de los genes terapéuticos que se han descubierto se ve limitada por la carencia de vectores adecuados para transportarlos a las células diana. Los vectores no virales son menos tóxicos. Su inocuidad es fundamental en estrategias dirigidas a transducir células normales: las células dendríticas en el caso de la inmunestimulación, las células endoteliales en antiangiogénesis, u otras células normales como progenitores hematopoyéticos de la médula ósea, o células normales de los tejidos que rodean el tumor en estrategias de quimio y radioprotección. Las estrategias dirigidas a trasducir células tumorales requieren vectores virales por su mayor eficiencia. Entre ellos, el adenovirus es el más utilizado por su baja patogenicidad y su elevada eficacia y estabilidad. Aun así, la inyección de los primeros vectores adenovirales directamente en el tumor, o en las cavidades

donde el tumor se localiza, consigue llevar el transgén sólo a unas pocas capas de células anexas al área inyectada. Por ello, el beneficio clínico obtenido ha sido escaso. Esta limitación se pretende paliar usando adenovectores de replicación selectiva en tumores. Por otro lado, su cápside se está modificando para dirigir el vector exclusivamente a la célula tumoral. Otras modificaciones de su cápside tratan de mejorar su permanencia en circulación para aumentar su eficacia en el tratamiento de tumores diseminados. Se vislumbra un agente replicativo capaz de mantenerse en circulación sanguínea, infectar selectivamente las células de los focos tumorales y replicarse selectivamente en el tumor. Parcialmente este agente imita al sistema inmune en sus propiedades de distribución sistémica, acción dirigida y amplificación, pero nos ofrece la esperanza de que su acción citotóxica no sea neutralizada por la célula tumoral.

BIBLIOGRAFIA

1. Alani RA and Münger K. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol* **16**: 330-337, 1998.
2. Anderson WF. Human gene therapy. *Science* **256**: 808-813, 1992.
3. Barinaga M. Designing therapies that target tumor blood vessels. *Science* **275**: 482-484, 1997.
4. Bayley ST, Mymryk JS. Adenovirus E1A proteins and transformation (review). *Int. J. Oncology*. **5**: 425-444, 1994.
5. Bishop JM: Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, **64**: 235-248, 1991.
6. Blaho JA and Aaronson SA. Convicting a human tumor virus:Guilt by association? *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7619-7621, 1999.
7. Blau HM, Springer ML. Gene therapy a novel form of drug delivery. *N Engl J Med* **333**: 1204-1207, 1995.
8. Blezinger, P., Wang, J., Gondo, M., Quezada, A., Mehrens, D., French, M., Singhal, A., Sullivan, S., Rolland, A., Ralston, R., Min, W.(1999). Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene. *Nat Biotechnol.*, **17**: 343-348.
9. Bonnet M et al. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst*, **91**: 1376-1381, 1999.
10. Brechot C. Molecular mechanisms of Hepatitis B and C viruses related to liver carcinogenesis. *Hepato-Gastroenterology* **45**: 1189-1196, 1998.
11. Bullerdiek J and Rommel B. Diagnostic and molecular implications of specific chromosomal translocations in mesenchymal tumors. *Histol. Histopathol*, **14**: 1165-1173, 1999.
12. Delattre, O. et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumors. *Nature* **359**, 162-165,1992.
13. Evan G. Cancer, a matter of life and cell death. *Int. J. Cancer* **71**: 709-711, 1997.
14. Farhood H, Gao X, Son K, Yang YY, Lazo JS, Huang L, Barsoum J, Bottega R, Epand RM. Gene therapy for neoplastic diseases. Cationic liposomes for direct gene transfer in therapy of cancer and other diseases. *Ann NY Acad Sci*; **716**: 23-36.
15. Fearon E and Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767, 1990.

16. Fisher DA. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 1994, **78**: 539-542.
17. Flaegstad et al. A possible contributory role of BK virus infection in neuroblastoma development. *Cancer Res*, **59**: 1160-1163, 1999.
18. Frisch S M, Reich R, Collier IE, Genrich T, Martin G, Goldberg GI. Adenovirus E1A represses protease gene expression and inhibits metastasis of human cells. *Oncogene*. **5**: 75-83, 1997.
19. Frisch SM. Antioncogenic effect of adenovirus E1A in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **88**: 9077-9081, 1991.
20. Frisch, S.M. E1A induces the expression of epithelial characteristics. *J. Cell Biol.* **127**, 1085-1096, 1994.
21. Graham FL, Prevec L. Manipulation of adenovirus vectors. In: Murray EJ, ed. *Methods in Molecular Biology: Gene transfer and expression protocols*. Clinton, NJ: *The Human Press Inc* 109-128, 1991.
22. Hinds PW and Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics and Development*, **4**: 135-141, 1994.
23. Hsu, F.J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T.M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E.G., and Levy, R. (1996) Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.*, **2**: 52-58.
24. Huang, X., Molema, G., King, S., Watkins, L., Edgington, T.S., Thorpe, P.E. (1997) Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science*, **275**: 547-50.
25. Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell* **88**: 333-346, 1997.
26. Kaminski, M.S., Zasadny, K.R., Francis, I.R., Fenner, M.C., Ross, C.W., Milik, A.W., Estes, J., Tuck, M., Regan, D., Fisher, S., Glenn, S.D., Wahl, R.L. (1996). Iodine-131-anti-B1 radioimmunotherapy for B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, **14**: 1974-1981.
27. Laghi L et al. JC virus DNA is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **96**: 7484-7489, 1999.
28. Latham, J.P., Searle, P.F., Mautner, V., and James, N.D. Prostate-specific antigen promoter/enhancer driven gene therapy for prostate cancer: construction and testing of a tissue-specific adenovirus vector. *Cancer Res.*, **60**: 334-341, 2000.

29. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323-331, 1997.
30. Mackey JK, Green M, Wold WS and Rigden P. Analysis of human cancer DNA for DNA sequences of human adenovirus type 4. *J Natl Cancer Inst*, **62**: 23-26, 1979.
31. Marchetti E; J. Romero; R. Sánchez; J.A. Vargas; J.C. Lacal; S. Ramón y Cajal. Oncogenes and cellular sensitivity to radio-therapy. A study on murine keratinocytes transformed by v-H-ras, v-myc, neu, adenovirus E1a and p53 mutant. *International J. of Oncology* **5**: 611-618, 1994.
32. Martin P; R. Sanchez-Prieto; J. Romero; A. Martinez; S. Cebrian; J. Guinea; C. Dominguez; A. Cano; M. Quintanilla and S. Ramon y Cajal. Marked in vivo response to DNA-damaging agents in malignant tumors expressing the adenovirus E1a gene. E1a y RX in vivo. *Int J Oncology*, **15**: 1163-1168, 1999.
33. Morsy MA, Mitani K, Clemens P, Caskey CT. Progress toward human gene therapy. *JAMA* **270**: 2338-2345, 1993.
34. Mymryk, J.S. and Smith, M.M. Influence of the adenovirus 5 E1A oncogene on chromatin remodelling. *Biochem. Cell Biol.* **75**, 95-102, 1997.
35. Mymryk, J.S. Tumor suppressive properties of the adenovirus 5 E1A oncogene. *Oncogene* **13**, 1581-1589, 1996.
36. Nauts, H.C.(1989). Bacteria and cancer-antagonisms and benefits. *Cancer Surv.*, **8**: 713-723.
37. Nguyen, J.T., Wu, P., Clouse, M.E., Hlatky, L., Terwilliger, E.F.(1998). Adeno-associated virus-mediated delivery of antiangiogenic factors as an antitumor strategy. *Cancer Res.*, **58**: 5673-5677.
38. Paulovich AG, Toczyski DP and Hartwell LH. When checkpoints fail. *Cell* **88**: 315-321, 1997.
39. Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*; **372**: 143: 149, 1994.
40. Ramón y Cajal S, R. Sánchez-Prieto; A. Anaya. A genetic model for undifferentiated cell tumor formation: similar tumors formed by different cell lines transformed by the E1a oncogene. *Histology and Histopathology*. **10**: 811-820, 1995.

41. Ramón y Cajal; S. Suster; R. Halaban; E. Filvaroff; P. Dotto. Induction of different morphological patterns of malignant melanoma in mice after transformation with bFGF, H-ras, myc, neu and E1a oncogenes. *Am. J. Pathology*. **138**: 349-358, 1991.
42. Richards, C.A., Austin, E.A., and Huber, B.E. Transcriptional regulatory sequences of carcinoembryonic antigen: Identification and use with cytosine deaminase for tumor-specific. *Hum. Gene. Ther.*, **6**: 881-893,1995.
43. Rosenberg SA. The immunotherapy and gene therapy of cancer. *J Clin Oncol* **10**: 180-199, 1992.
44. Rosenberg, S.A, Yannelli, J.R, Yang, J.C, Topalian, S.L, Schwartzentruher, D.J, Weber, J.S, Parkinson, D.R, Seipp, C.A, Einhorn, J.H, White, D.E.(1994). Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **86**: 1159-1166.
45. Rosenberg, S.A., Lotze, H., Yang, J.C., Aebersold, P.M., Lineham, W.M., Seipp, C.A., and White, D.E. (1989). Experience with the use of high-dose interleukine-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Ann. Surg.*, **210**: 474-484.
46. Sánchez-Prieto R, Quintanilla M, Cano A, LLeonart M, Martín P, Anaya A, Ramón y Cajal S. Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1a gene. *Oncogene* **13**: 1083-1092, 1996.
47. Sanchez-Prieto R, Vargas JA, Carnero A, Marchetti E, Romero J, Durantez A, Lacal JC and Ramón y Cajal S. Modulation of cellular chemoresistance in keratinocytes by activation of different oncogenes. *International Journal of Cancer* **60**: 235-243, 1995.
48. Sanchez-Prieto R; E. De Alava; M. T Palominoi, J Guinea, V Fernandez, S Cebrian, Lleonart; P. Cabello; P. Martin C. SanRoman; R. Borstein; J Pardo,; A. Martinez; F. Diaz Espada; Yve Barrios and S. Ramon y Cajal. An association between viral genes and human oncogenic alterations. The adenovirus E1a induces the Ewing 's sarcoma fusion transcript. *Nature Medicine*, **5**: 1076-1081, 1999.
49. Sánchez-Prieto R; M. Quintanilla; P. Martín; M. Lleonart; A. Cano; G.P. Dotto; S. Ramón y Cajal. In vivo antitumor effect of retrovirus-mediated transfer of the adenovirus E1a gene. *Cancer Gene Therapy*, **5(4)**: 215-224, 1998.
50. Staba, M.J., Wickham, T.J., Kovesdi, I. and Hallahan, D.E. Modifications of the fiber in adenovirus vectors increase tropism for malignant glioma models. *Cancer. Gene Ther.*, **7**: 13-19, 2000.

51. Teodoro JG, Shore GC, Branton PE. Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene*. **11**: 467-474, 1995.
52. Testa JR et al A multi-institutional study confirms the presence and expression of simian virus 40 in human malignant mesotheliomas
53. Torre E, Salimbeni V and Fulco RA. The erbB 2 oncogene and chemotherapy: a mini-review. *J Chemother*, **9**:51-55, 1997.
54. Vile, R.G and Hart. In vitro and in vivo targeting of gene expression to melanoma cells. *Cancer Res.*, **53**: 962-967,1993.
55. Wagnes RF. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* **372**: 333-335, 1994.
56. Young LS, Dawson CW and Eliopoulos AG. Viruses and apoptosis. *British Medical Bulletin* 1997; **53**: 509-521.
57. Zhu, J., Gao, B., Zhao, J., and Balmain, A. Targeting gene expression to tumor cells with loss of wild-type p53 function. *Cancer Gene Ther.*, **7**: 4-12, 2000.
58. Bischoff, J.R., Kirn, D., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, N., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattae, A., and McCormick, F. (1996), An adenovirus mutant that replicates selectively in p53 deficient human tumor cells. *Science.*, **274**: 373-376.0.
59. Heise, C.C., Williams, A., Olesch, J., and Kirn, D. H. (1999). Efficacy of a replication-competent adenovirus (ONYX-015) following intratumoral injection: Intratumoral spread and distribution effects. *Cancer Gene Ther.*, **6**: 499-504.
60. Hall, A.R., Dix, B.R., O' Carroll, S.J., and Braithwaite, A.W. (1998). p53-dependent cell death/ apoptosis is required for a productive adenovirus infection. *Nat. Med.*, **4**: 1068-1072.
61. Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P.S.Y., McDonnell, T.J., Mitlianga, P., Shi, Y-X., Levin, V.A., Yung, W.K. and Kyritsis, A.P. (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect *in vivo*. *Oncogene.*, **19**: 2-12.
62. Martin-Duque, P., Alonso, C., Sanchez-Prieto, R., Lleonart, M., Martinez, C., Gonzalez de Buitrago, G., Cano, A., Quintanilla, M., and Ramon y Cajal, S. (1999). Adenovirus lacking 19-kDa and 55-kDa E1B genes exerts a marked cytotoxic effect in human malignant cells. *Cancer Gene Ther.*, **6**: 554-563.

63. Gabizon, A., Catane, R., Uziely, B., Kaufman, B., Safra, T., Cohen, R., Martin, F., Huang, A. & Barenholz, Y. (1994). Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res* **54**, 987-92.
64. Culver, K. W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E. H. & Blaese, R. M. (1992). In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* **256**, 1550-2.
65. Horwitz, M. S. (1996). Adenoviruses. In *Fields Virology*, Third edn, pp. 2149-2171. Edited by B. N. Fields, D. N. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven.
66. Gorziglia, M. I., Lapceovich, C., Roy, S., Kang, Q., Kadan, M., Wu, V., Pechan, P. & Kaleko, M. (1999). Generation of an adenovirus vector lacking E1, E2a, E3, and all of E4 except open reading frame 3. *J Virol* **73**, 6048-55.
67. Yang, Y., Trinchieri, G. & Wilson, J. M. (1995). Recombinant IL-12 prevents formation of blocking IgA antibodies to recombinant adenovirus and allows repeated gene therapy to mouse lung. *Nat Med* **1**, 890-3.
68. Alemany, R., Dai, Y., Lou, Y. C., Sethi, E., Prokopenko, E., Josephs, S. F. & Zhang, W. W. (1997). Complementation of helper-dependent adenoviral vectors: size effects and titer fluctuations. *J Virol Methods* **68**, 147-59.
69. Fallaux, F. J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D. J., Hehir, K. M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S. J., van Ormondt, H., van der Eb, A. J., Valerio, D. & Hoeben, R. C. (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* **9**, 1909-17.
70. Serman, D. H., Treat, J., Litzky, L. A., Amin, K. M., Coonrod, L., Molnar-Kimber, K., Recio, A., Knox, L., Wilson, J. M., Albelda, S. M. & Kaiser, L. R. (1998). Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. *Hum Gene Ther* **9**, 1083-92.
71. Herman, J. R., Adler, H. L., Aguilar-Cordova, E., Rojas-Martinez, A., Woo, S., Timme, T. L., Wheeler, T. M., Thompson, T. C. & Scardino, P. T. (1999). In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* **10**, 1239-49.

72. Schuler, M., Rochlitz, C., Horowitz, J. A., Schlegel, J., Perruchoud, A. P., Kommos, F., Bolliger, C. T., Kauczor, H. U., Dalquen, P., Fritz, M. A., Swanson, S., Herrmann, R. & Huber, C. (1998). A phase I study of adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Hum Gene Ther* **9**, 2075-82.
73. Nemunaitis, J., Swisher, S. G., Timmons, T., Connors, D., Mack, M., Doerksen, L., Weill, D., Wait, J., Lawrence, D. D., Kemp, B. L., Fossella, F., Glisson, B. S., Hong, W. K., Khuri, F. R., Kurie, J. M., Lee, J. J., Lee, J. S., Nguyen, D. M., Nesbitt, J. C., Perez-Soler, R., Pisters, K. M., Putnam, J. B., Richli, W. R., Shin, D. M., Walsh, G. L. & et al. (2000). Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **18**, 609-22.
74. Clayman, G. L., el-Naggar, A. K., Lippman, S. M., Henderson, Y. C., Frederick, M., Merritt, J. A., Zumstein, L. A., Timmons, T. M., Liu, T. J., Ginsberg, L., Roth, J. A., Hong, W. K., Brusio, P. & Goepfert, H. (1998). Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* **16**, 2221-32.
75. Bowman, L., Grossmann, M., Rill, D., Brown, M., Zhong, W. Y., Alexander, B., Leimig, T., Coustan-Smith, E., Campana, D., Jenkins, J., Woods, D., Kitchingman, G., Vanin, E. & Brenner, M. (1998). IL-2 adenovector-transduced autologous tumor cells induce antitumor immune responses in patients with neuroblastoma. *Blood* **92**, 1941-9.
76. Stewart, A. K., Lassam, N. J., Quirt, I. C., Bailey, D. J., Rotstein, L. E., Krajden, M., Dessureault, S., Gallinger, S., Cappe, D., Wan, Y., Addison, C. L., Moen, R. C., Gaudie, J. & Graham, F. L. (1999). Adenovector-mediated gene delivery of interleukin-2 in metastatic breast cancer and melanoma: results of a phase 1 clinical trial. *Gene Ther* **6**, 350-63.
77. Wickham, T. J. (2000). Targeting adenovirus. *Gene Ther* **7**, 110-4.
78. Staba, M. J., Wickham, T. J., Kovessi, I. & Hallahan, D. E. (2000). Modifications of the fiber in adenovirus vectors increase tropism for malignant glioma models. *Cancer Gene Ther* **7**, 13-9.
79. Pasqualini, R., Koivunen, E., Kain, R., Lahdenranta, J., Sakamoto, M., Stryhn, A., Ashmun, R. A., Shapiro, L. H., Arap, W. & Ruoslahti, E. (2000). Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* **60**, 722-7.
80. Curiel DT. Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery. *Ann. N.Y. Acad Sci* (1999); **886**: 158-171.

81. Alemany, R., Suzuki, K. & Curiel, D. T. (2000b). Blood clearance of adenovirus type 5 in mice. *J. General Virology*.
82. Sinkovics, J. & Horvath, J. (1993). New developments in the virus therapy of cancer: a historical review. *Intervirology* **36**, 193-214.
83. Smith, R. R., Huebner, R. J., Rowe, W. P., Schatten, W. F. & Thomas, L. B. (1956). Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* **9**, 1211-1218.
84. Markert, J. M., Medlock, M. D., Rabkin, S. D., Gillespie, G. Y., Todo, T., Hunter, W. D., Palmer, C. A., Feigenbaum, F., Tornatore, C., Tufaro, F. & Martuza, R. L. (2000). Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther* **7**, 867-74 the above report in.
85. Alemany, R., Balague, C. & Curiel, D. T. (2000a). Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol* **18**, 723-727.
86. Alemany, R., Lai, S., Lou, Y. C., Jan, H. Y., Fang, X. & Zhang, W. W. (1999). Complementary adenoviral vectors for oncolysis. *Cancer Gene Ther* **6**, 21-5.
87. Yu, D. C., Sakamoto, G. T. & Henderson, D. R. (1999). Identification of the transcriptional regulatory sequences of human kallikrein 2 and their use in the construction of calydon virus 764, an attenuated replication competent adenovirus for prostate cancer therapy. *Cancer Res* **59**, 1498-504.
88. Steinwaerder, D. S. & Lieber, A. (2000). Insulation from viral transcriptional regulatory elements improves inducible transgene expression from adenovirus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther* **7**, 556-67.
89. Bischoff, J. R., Kim, D. H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J. A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A. & McCormick, F. (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* **274**, 373-6.
90. Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P. S., McDonnell, T. J., Mitlianga, P., Shi, Y. X., Levin, V. A., Yung, W. K. & Kyritsis, A. P. (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* **19**, 2-12.
91. Shinoura, N., Yoshida, Y., Tsunoda, R., Ohashi, M., Zhang, W., Asai, A., Kirino, T. & Hamada, H. (1999). Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant E1B-defective adenovirus for gene therapy of gliomas. *Cancer Res* **59**, 3411-6.

92. Khuri, F. R., Nemunaitis, J., Ganly, I., Arseneau, J., Tannock, I. F., Romel, L., Gore, M., Ironside, J., MacDougall, R. H., Heise, C., Randlev, B., Gillenwater, A. M., Brusio, P., Kaye, S. B., Hong, W. K. & Kirn, D. H. (2000). A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* **6**, 879-85.