

TERAPIA GENICA ANTITUMORAL MEDIANTE EL USO DE GENES SUICIDAS*

MARIANA BERENSTEIN^{1,2}, SORAYA ADRIS^{1,2}, FERNANDA LEDDA^{1,3}, CLAUDIA WOLFMANN⁴, JORGE MEDINA⁴, ALICIA BRAVO⁵, JOSE MORDOH¹, YUTI CHERNAJOVSKY⁶, OSVALDO L. PODHAJECER^{1,3}

¹ Fundación Campomar, ² Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; ³ Instituto de Biología Celular, Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires; ⁴ Hospital Eva Perón, Pcia de Buenos Aires; ⁵ Kennedy Institute of Rheumatology, London, UK

Resumen Células tumorales transducidas con vectores retrovirales portando el gen de la timidina kinasa del virus herpes simplex-1 (HSV-tk), son capaces de transformar la droga antiherpética ganciclovir (GCV) en un metabolito tóxico para células en división. Esta terapia suicida aumenta su eficiencia debido a un efecto "bystander" que induce la muerte de células no transducidas, vecinas a células modificadas. El mecanismo del mencionado efecto no se conoce totalmente, pero existe evidencia que asigna un rol preponderante al sistema inmune, para lograr una completa erradicación tumoral. En este trabajo estudiamos la efectividad del sistema en tres líneas celulares: un melanoma humano y uno murino, y un glioma de rata. Los tumores fueron establecidos por inyección de células tumorales s.c. en ratones nude y C57Bl/6, e intracerebralmente por estereotaxis en ratas Sprague Dawley, respectivamente. Animales tratados fueron co-inyectados con células productoras de retrovirus expresando HSV-tk y posterior administración i.p. de GCV. En experimentos in vivo a corto plazo, se observó inhibición total o parcial del crecimiento tumoral en todos los modelos. En experimentos de supervivencia a largo plazo con células C6, el 50% de los animales sobrevivió más de 75 días ($p < 0.0001$) y fue capaz de rechazar un desafío con células parentales C6 inyectadas en el hemisferio contralateral. El análisis histológico e inmunohistoquímico mostró la presencia de un infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos T, macrófagos y polimorfonucleares. Estos resultados demuestran que el uso de genes suicidas puede ser una herramienta de enorme importancia en el tratamiento de tumores de cerebro y de metástasis cerebrales.

Abstract *Cancer gene therapy using suicide genes.* Tumor cells transduced with retrovirus carrying the herpes simplex-1 virus thymidine kinase (HSV-tk) are capable of transforming the antiviral drug ganciclovir (GCV) into a metabolic form only toxic to dividing cells. The efficiency of this suicide gene therapy is increased by a "bystander" effect resulting not only in the death of the recipient cell, but also in the death of non modified surrounding cells. Even though the mechanism of this "bystander" effect remains to be elucidated, strong evidence suggest that the immune system plays a main role to achieve complete tumor eradication. In the present study we evaluate the efficiency of this suicide system on three different tumor models: one human melanoma, one murine melanoma, and a rat glioblastoma. Tumors were established by injection of tumor cells s.c. in nude and C57Bl/6 mice, respectively, and stereotactically into the brain of Sprague Dawley rats. Animals in the treated group were co-injected with packaging cells producing recombinant retrovirus carrying the HSV-tk gene, and followed by i.p. administration of GCV. In short term studies, we observed inhibition of tumor growth for all the tumor models evaluated ($p < 0.01$). In long term studies, using the C6 rat glioma line, 50% of the animals survived longer than 75 days ($p < 0.0001$), and were able to reject a contralateral challenge with C6 parental cells. Histological and immunohistochemical analysis showed the presence of an inflammatory infiltrate composed by T lymphocytes, macrophages and polymorphonuclear cells. These data demonstrate that suicide genes might represent an attractive form of cancer gene therapy in the treatment of brain tumors and their intracerebral dissemination.

Key words: cancer gene therapy, suicide genes, herpes simplex-1 virus thymidine kinase, ganciclovir, brain tumor

La transferencia de genes suicidas se ha convertido en una forma de terapia antitumoral atractiva, especialmente par tumores de cerebro^{1,2}. La expresión del gen

de la timidina kinasa del herpes virus (HSV-tk) vuelve a las células susceptibles a la droga antiherpética ganciclovir (GCV), llevando así a la muerte no sólo de las células modificadas, sino también de las células vecinas que no expresan el gen suicida^{2,3}. Este efecto "bystander" es importante debido a la baja eficiencia de transducción in vivo de tumores con los vectores utilizados actualmente. Existen distintas hipótesis para explicar el mecanismo de dicho efecto, incluyendo la transferencia de metabolitos tóxicos de GCV vía "gap junctions"⁴ y la fagocitosis de

* Trabajo premiado durante la reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, noviembre 1997.

² M B y SA contribuyeron de igual manera al trabajo.

Dirección postal: Dr. Osvaldo Pdhajcer, Fundación Campomar, Av. Patricias Argentinas 435, 1405 Buenos Aires, Argentina
Fax: 54-1-8652246, E-mail: opodhote@iris.iib.uba.ar

vesículas apoptóticas liberadas por células muertas por GCV⁵. La implicancia de dichos mecanismos en la mediación del efecto "bystander" in vitro ha sido demostrada, pero existe una evidencia cada vez mayor que asigna un rol preponderante al sistema inmune, a fin de conseguir una erradicación tumoral completa^{1, 6, 7}.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los mecanismos involucrados en el rechazo tumoral in vivo luego de la transferencia del gen suicida HSV-tk y el tratamiento posterior con GCV. Utilizamos para ello células de melanoma murino B16 y de glioma de rata C6 inyectadas en animales singéneos inmunocompetentes, así como también células de melanoma humano IIB-MEL-LES inyectadas en ratones nude. Los resultados obtenidos permiten demostrar la existencia de un componente inmunológico en el efecto bystander in vivo, y su relevancia para conseguir una erradicación tumoral completa luego del tratamiento con HSV-tk/GCV.

Inicialmente realizamos la construcción del vector retroviral llamado pAGO, conteniendo el gen HSV-tk. El gen HSV-tk fue aislado del plásmido pAGO⁸ como un fragmento de 1.7kb por corte con BglIII-PvuII. El vector pBabe Neo fue cortado con EcoRI, rellenando el sitio con enzima Klenow para generar extremos romos, y redigerido con BamHI. El fragmento de 1.7kb fue subclonado en los sitios BamHI-EcoRI de pBabe Neo, generando de este modo el vector recombinante pAGO. Dicho vector fue utilizado para transfectar células empaquetadoras de partículas virales GP+envAm12 a fin de producir retrovirus recombinantes (células Am12pAGO)⁹.

Por transducción con el retrovirus pAGO de las líneas de melanoma humano, melanoma murino y glioma de rata, se obtuvieron los clones LESpAGO, B16pAGO y C6pAGO, respectivamente, que expresan de modo estable el gen HSV-tk y son completamente eliminados por GCV a una dosis de 50 μ M.

Dichos clones fueron seleccionados para los estudios in vitro e in vivo.

Al estudiar la presencia de un efecto "bystander" in vitro, se observó que la presencia de sólo un 25% de células modificadas C6pAGO fue suficiente para eliminar más del 85% de la población celular total. El mencionado efecto sólo fue observado para el modelo de glioma de rata C6, y sólo cuando las células eran plaqueadas a alta densidad, permitiendo contacto célula-célula, lo que sugiere la importancia de los "gap junctions".

Iniciamos los estudios in vivo inyectando ratones "nude" por vía subcutánea (s.c.) con 2×10^6 células de melanoma humano IIB-MEL-LES mezcladas 1:1 con Am12 pAGO o Am12 β gal (conteniendo el gen de la β galactosidasa bacteriano) como control. Un segundo control consistió en inyectar Am12pAGO sin posterior tratamiento con GCV. A los 7 días se inició el tratamiento por inyección intraperitoneal (i.p.) de GCV 25 mg/kg, dos veces por día,

durante 14 días. Si bien el volumen tumoral de los animales tratados ($0.05 \pm 0.02 \text{ cm}^3$) fue menor que el control ($0.45 \pm 0.05 \text{ cm}^3$) durante los primeros 20 días, al término del experimento (50 días), todos los tumores tenían un volumen similar. Si bien estos resultados suponen un efecto inicial del sistema HSV-tk/GCV en la inhibición del crecimiento del melanoma humano, no se pudo obtener información sólida dado que las células Am12pAGO crecen en ratones nude en ausencia de GCV.

Para evaluar el sistema del gen suicida en animales inmunocompetentes, primero se estudió el crecimiento de células B16pAGO inyectando 1.5×10^5 células en el flanco de ratones singéneos C57Bl/6. En un experimento tipo, uno de los grupos fue tratado con GCV i.p. 25 mg/kg ($n = 5$) dos veces por día durante 7 días, mientras el grupo control recibió solución salina ($n = 5$). Otro grupo control fue inyectado con B16 y tratado con GCV ($n = 5$). Los ratones inyectados con B16pAGO y tratados con GCV no desarrollaron tumor, mientras que los grupos controles mostraron al día 30 tumores mayores a 1.5 cm^3 ($p < 0.01$). En ensayos posteriores se inyectaron 1.5×10^5 células B16 junto con 9×10^5 células Am12pAGO, seguido del tratamiento con GCV ($n = 5$). Animales control recibieron solución salina en lugar de GCV ($n = 5$). Una diferencia estadísticamente significativa pudo observarse entre el volumen promedio de los tumores de animales tratados con GCV ($1.5 \pm 0.4 \text{ cm}^3$) comparado con el de animales control ($3.7 \pm 0.9 \text{ cm}^3$) a los 27 días de iniciados los experimentos ($p < 0.01$). Estos resultados demuestran que los retrovirus producidos por células Am12pAGO fueron capaces de infectar in vivo a células B16, volviéndolas sensibles a la droga GCV.

Para el modelo de glioma de rata C6, se establecieron tumores intracerebrales por inoculación estereotáxica de 4×10^4 células C6 en el hemisferio derecho de ratas Sprague Dawley. Ratas en el grupo tratado fueron coinyectadas con 4×10^4 C6 junto con 5×10^5 células productoras de vector pAGO (Am12pAGO). A los 5 días se inició el tratamiento, administrando GCV i.p. a razón de 15 mg/kg, 2 veces por día, durante 15 días.

En estudios a corto plazo, se observó que los animales del grupo control desarrollaron masas tumorales de gran tamaño las cuales ocupaban todo el hemisferio derecho produciendo la muerte entre los 20 y los 22 días posteriores a la inoculación de las células C6 (Fig. 1a). Los animales del grupo tratado sobrevivieron a los del grupo control y sus estudios histológicos mostraron ausencia completa o mínimo tumor residual (Fig. 1b) ampliamente infiltrado por linfocitos T, macrófagos y polimorfonucleares (Fig. 1c), los cuales fueron caracterizados por estudios inmunohistoquímicos. En experimentos a largo plazo, se inyectaron por estereotaxia células C6, observándose que los animales control tuvieron una sobrevivida promedio de 20 ± 4 días. Por otro lado, ratas inyectadas con C6 + Am12pAGO y tratadas

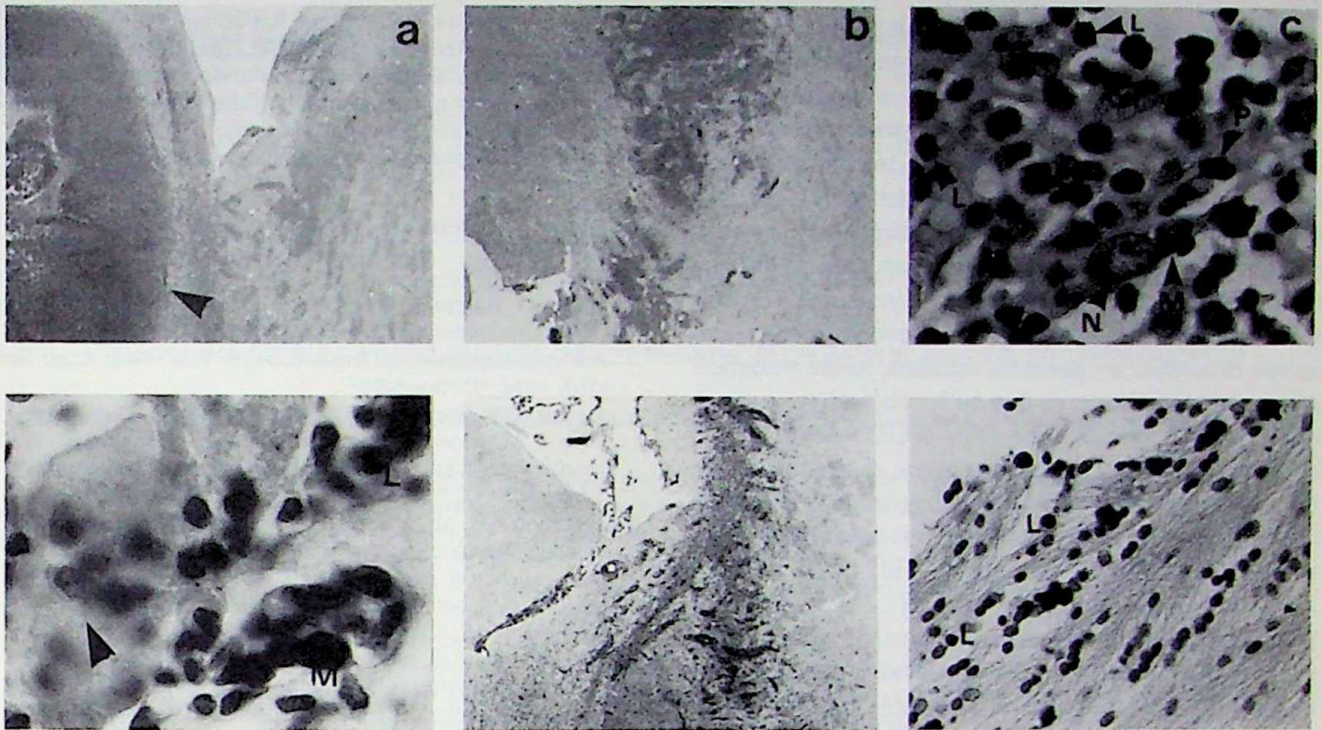


Fig. 1.- Estudios histológicos sobre secciones de cerebros de ratas inyectadas con células de glioma C6 con o sin tratamiento con HSV/GCV. En estudios a corto plazo se observa: a) en sección correspondiente a animal control cómo la masa de células tumorales ocupa todo el hemisferio inyectado (H-E), b) mientras en cortes de tejido de una rata inyectada con células C6 + Am12pAGO y tratada con GCV, aparece una pequeña zona de tumor residual, c) la cual muestra a mayor aumento presencia de linfocitos T(L) macrófagos (M) y polimorfonucleares (P) rodeando una célula tumoral residual (N). En estudios a largo plazo se analizaron cerebros de animales desafiados, d) luego de 15 días, mostrando fragmentos nucleares y citoplasmáticos (flecha) rodeados de infiltrado de linfocitos T(L), macrófagos (M) y polimorfonucleares (P), e) a los 20 días, observándose tumor residual en uno de los animales del lado del desafío, f) y 65 días posteriores al desafío. En este caso el cerebro no muestra presencia de células tumorales, pero sí un alto número de células gliales activadas y un alto infiltrado inflamatorio, compuesto principalmente por linfocitos T(L). Magnificación a, b) 100x; c, d, f) 1000x; f) 400x.

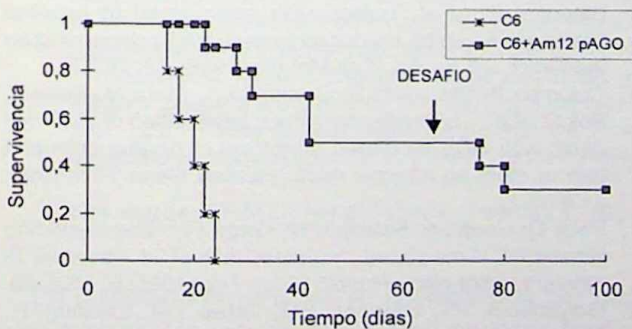


Fig. 2.- Curva de supervivencia de ratas inyectadas con células de glioma C6 4×10^4 células C6 fueron inyectadas por estereotaxis en el núcleo caudado derecho. Animales dentro del grupo tratado recibieron una co-inyección con 5×10^5 células Am12pAGO. Todos los animales fueron inyectados con GCV. La flecha indica el tiempo al cual se realizó el desafío contralateral, luego de la primera inoculación del tumor.

Cuatro animales dentro del grupo de mayor supervivencia, fueron desafiados a los 65 días de la primera inyección tumoral, con 4×10^4 células C6 parentales en el hemisferio izquierdo. Todos los animales del grupo control no sobrevivieron más de 18 días, mostrando masas tumorales visibles macroscópicamente. El cerebro de una de las ratas sometidas al desafío, fue analizado 15 días después, observándose ausencia de células tumorales en ambos hemisferios, pero con zonas necróticas rodeadas de infiltrado inflamatorio (Fig. 1d). El cerebro de otro de los animales analizado a los 20 días del desafío, se encontraba libre de tumor en el hemisferio derecho (sitio de la primera inoculación), y sólo contenía un pequeño tumor residual del lado del desafío (Fig. 1e), también con presencia de células inflamatorias. Las otras dos ratas fueron sacrificadas a los 130 días, 65 días después de la segunda inoculación. En ambos casos, no se observó evidencia de tumor en ninguno de los hemisferios. En cortes seriados, pudo observarse proliferación glial, desorganización del tejido, e infiltrado de macrófagos y linfocitos T, en el sitio de la segunda inyección (Fig. 1f).

con GCV, sobrevivieron en promedio 45 ± 23 días, con el 50% de los animales (5/10) sobreviviendo más de 75 días ($p < 0.0001$) (Fig. 2).

Estos estudios muestran evidencias de que existe una respuesta inmunológica de memoria generada luego de la transducción con el gen HSV-tk y el posterior tratamiento con GCV. Esto pudo demostrarse para el modelo experimental de glioma de rata C6, mientras el modelo B16 no mostró rechazo total, probablemente debido a la baja inmunogenicidad de las células B16 comparadas con las células C6. Por otra parte, estudios en ratones inmunodeficientes mostraron un menor efecto antitumoral. Si bien este último punto no pudo ser completamente dilucidado en nuestros estudios, existe evidencia previa de la literatura, ya que se ha observado una menor eficiencia del sistema HSV-tk/GCV en animales inmunodeficientes^{7,10}. Estudios previos en la erradicación de tumores, descritos en la literatura, también muestran la variabilidad en el efecto antitumoral del sistema HSV-tk/GCV, dependiendo del tipo tumoral¹¹ y del nivel de inmunogenicidad del modelo utilizado¹². Todos estos datos son importantes cuando se extrapolan los datos experimentales en animales a tumores humanos, especialmente en el caso de tumores de cerebro que son considerablemente menos inmunogénicos que los modelos experimentales de uso corriente¹³.

Por otro lado, la inducción de CTLs específicos antitumorales¹⁴ y una expresión aumentada de las moléculas coestimuladoras B7e ICAM¹⁵, posterior al tratamiento con HSV-tk y GCV, sugiere que este sistema produciría señales inmunoestimuladoras luego de la muerte celular, permitiendo al sistema inmune del huésped reconocer y eliminar células tumorales residuales, que no expresan HSV-tk.

El uso combinado de HSV-tk/GCV con la expresión de genes de citoquinas que contribuyan a aumentar la respuesta "bystander" inmunológica, o la inmunización del huésped con antígenos específicos de tumor, son alternativas promisorias para aumentar el reconocimiento tumoral y su posterior rechazo por el sistema inmune⁶. Lo mencionado adquiere mayor importancia si se considera que la mayoría de los pacientes con tumores de cerebro primario exhiben una marcada inmunosupresión¹³. Si bien no se han obtenido resultados positivos utilizando en estudios preliminares IL-2, INF alfa e IL-4 han mostrado efectos positivos al ser combinados con HSV-tk/GCV.

En nuestro laboratorio, hemos iniciado estudios tendientes al uso combinado del sistema HSV-tk/GCV con citoquinas estimuladoras de la respuesta Th1 y Th2.

En conclusión, nuestros estudios demuestran que la transducción de gliomas de rata y melanomas murinos con el gen HSV-tk, seguido del tratamiento con GCV, lleva a la inhibición del crecimiento tumoral y al desarrollo de una memoria inmunológica antitumoral, abriendo la posibilidad del desarrollo de este sistema para el eventual inicio de ensayos clínicos.

Agradecimientos: Este trabajo fue apoyado por subsidios de la Fundación Roemmers y FUCA; agradecemos a Fabio Fraga, responsable del bioterio de la Fundación por su amplia asistencia técnica y a la Lic. Carolina Carrillo por su colaboración en la preparación de este manuscrito.

El GCV fue gentilmente donado por laboratorios RONTAG S.A.

Bibliografía

1. Barba D, Hardin J, Saledain M, Gage FH. Development of antitumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3348-52.
2. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishi H, Oldfield EH, Blaese M. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 1992; 256: 1550-2.
3. Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, et al. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993; 53: 5274-83.
4. Ishii-Morita H, Agbaria R, Mullen CA, Hirano H, Koeplin DA, Ram Z, et al. Mechanism of "bystander effect" killing in the herpes simplex thymidine kinase gene therapy model of cancer treatment. *Gene Therapy* 1997; 4: 244-51.
5. Hamel W, Magnelli L, Chiarogi VP, Israel MA. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. *Cancer Res* 1996; 56: 2696-702.
6. Freeman SM, Ramesh R, Marrogi AJ. Immune system in suicide-gene therapy. *Lancet* 1997; 349: 2-3.
7. Gagandeep S, Brew R, Green B, Christmas SE, Klatzmann D, Poston GJ, et al. Prodrug-activated gene therapy: Involvement of an immunological component in the "bystander effect". *Human Gene Ther* 1996; 3: 83-8.
8. Colbere-Garapin F, Chousterman S, Horodniceau F, Kourilsky P and Garapin A-C. Cloning of the active thymidine kinase gene of the HSV type I in *E. coli* K12. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 3755-9.
9. Ledda MF, Adris S, Bravo AI, Bover L, Carbone C, Paleolog E, et al. Tumor cells engineered to express interleukin-6 exhibit a reduced tumorigenicity depending on the tumor cell model. *Cell Mol Biol* 1996; 42: 769-78.
10. Colombo B, Benedetti S, Ottolenghi S, Mora M, Pollo B, Poli G, et al. The bystander effect: association of U-87 cell death with GCV-mediated apoptosis of nearby cells and lack of effect on athymic mice. *Human Gene Ther* 1996; 6: 763-72.
11. Beck C, Hardin J, Saledain M, Gage FH. The thymidine kinase/GCV-mediated "suicide" effect is variable in different tumor cells. *Human Gene Ther* 1995; 6: 1525-30.
12. Golubeck PT, Hamzett FM, Jafee EM, Levitsky H, Lietman PS, Pardoll DM. Herpes simplex-1 virus thymidine kinase gene is unable to completely eliminate live, nonimmunogenic tumor cell vaccines. *J Immunother* 1992; 12: 224-30.
13. Roszman R, Elliot L, Brooks W. Modulation of T-cell function by gliomas. *Immunology Today* 1991; 12: 370-4.
14. Yamamoto S, Suzuki S, Hoshino A, Akomoto M, Shimada T. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated killing of tumor cells induces tumor-specific cytotoxic T cells in mice. *Cancer Gene Ther* 1997; 4: 91-6.
15. Ramesh R, Munshi A, Abboud CN, Marrogi AJ, Freeman SM. Expression of co-stimulatory molecules: B7 and ICAM upregulation after treatment with suicide gene. *Cancer Gene Ther* 1996; 3:373-84.