



II REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE TERAPIA GÉNICA

28-29 DE MARZO DE 2003

Casa Convallescència, Barcelona

www.uv.es/SETG

ÍNDICE

Programa del Curso	4
Ponencias y Comunicaciones Orales	7
Comunicaciones Póster	29
Comités	46

PROGRAMA

VIERNES 28/03/2003

- 10:00-12:00** Entrega Documentación y Nuevas Inscripciones
- 12:00-12:30** BIENVENIDA
Ilmo. Sr. Vladimir de Semir i Zivojnovic. Regidor Ponent de la Ciutat del Coneixement, Ajuntament de Barcelona
- 12:30-13:30** CONFERENCIA INAUGURAL
EFFICIENT DELIVERY, ROBUST LONG-TERM EXPRESSION, TARGETING AND EXOGENOUS REGULATION OF TRANSGENES IN VIVO BY LENTIVIRAL VECTORS. *Luigi Naldini. Universidad de Turín (Italia)*
- 13:30-15:00** Comida
- 15:00-16:20** SESIÓN I. VECTORES DE TERAPIA GÉNICA
15:00-15:50 HACIA LA MAYORÍA DE EDAD DE LA TERAPIA GÉNICA NO VIRAL
Salvador Aliño. Universidad de Valencia
- 15:50-16:00** COMUNICACION ORAL 1: IMPROVED DOXYCYCLINE-DEPENDENT EXPRESSION VECTORS WITH LOW BASAL ACTIVITY AND HIGH INDUCIBILITY FOR THE SPECIFIC REGULATION OF INTERLEUKIN-12 IN THE LIVER. *M. Zabala*
- 16:00-16:10** COMUNICACION ORAL 2: GENERACION DE ADENOVIRUS GUTLESS "HELPER-FREE" COMO VECTORES DE TERAPIA GÉNICA MEDIANTE LA UTILIZACION DE LA RECOMBINASA UNIDIRECCIONAL FC31. *R. Alba*
- 16:10-16:20** COMUNICACION ORAL 3: USE OF SV40 RECOMBINANT VIRUSES AS VECTORS FOR GENE THERAPY. *M.Vera*
- 16:20-16:40** Pausa/Café
- 16:40-18:00** SESIÓN II. NUEVAS TECNOLOGÍAS
16:40-17:30 INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL VIH MEDIADA POR RNAs INTERFERENTES.
Miguel Angel Martínez, F. irsiCaixa, Barcelona
- 17:30-17:40** COMUNICACION ORAL 1: LA ELECTROTRANSFERENCIA A MÚSCULO DE UN PREPARADO DE DNA CONJUGADO CON SP1017 AUMENTA LA EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN Y FACILITA LA DISTRIBUCIÓN DE hHGF A TEJIDOS PERIFÉRICOS DE RATA. *M. Riera*
- 17:40-17:50** COMUNICACION ORAL 2: INHIBITING EXPRESSION OF SPECIFIC GENES IN MAMMALIAN CELLS USING MODIFIED U1 snRNPS. *P. Fortes*
- 17:50-18:00** COMUNICACION ORAL 3: TERAPIA GÉNICA DE PIEL: GENERACIÓN DE UN VECTOR LENTIVIRAL PARA LA EXPRESION INDUCIBLE DE PROTEÍNAS EN PROCESOS DE CICATRIZACIÓN CUTÁNEA. *M. Del Rio*
- 18:00-20:00** SESIÓN DE PÓSTERS

SÁBADO 29/03/2003

- 09:00-11:20** SESIÓN III. SIMPOSIO. CÉLULAS TRONCALES (MADRE)
- 09:00-09:50** HEMATOPOIESIS, STEM CELLS AND STEM CELL FATE DECISIONS IN MURINE MODELS
Stefan Karlsson, Universidad de Lund (Suecia)
- 09:50-10:40** GENE THERAPY OF INHERITED SKIN BLISTERING DISEASES.
Guerrino Meneguzzi. INSERM U385, Faculty of Medicine, Nice, France.
- 10:40-10:50** COMUNICACION ORAL 1: CORRECCIÓN GENÉTICA DEL DEFECTO HEMATOPOYÉTICO EN RATONES DEFICIENTES EN EL GEN DE ANEMIA DE FANCONI A. *P. Río*
- 10:50-11:00** COMUNICACION ORAL 2: CAPACIDAD HEMATOPOYÉTICA DE CÉLULAS MUSCULARES Y SU APLICACIÓN EN TERAPIA GÉNICA. *M. Ramírez*
- 11:00-11:10** COMUNICACION ORAL 3: "CYTOKINE-HUMANIZED" IMMUNODEFICIENT MOUSE FOR HUMAN NEO-ORGAN FORMATION BY LENTIVIRAL VECTOR MICROINJECTION OF SINGLE CELL EMBRIOS. *I.Punzón*
- 11:20-11:40** Pausa/Café
- 11:40-13:30** SESIÓN IV. ENFERMEDADES HEREDITARIAS Y METABÓLICAS
- 11:40-12:30** GENE THERAPY FOR TYPE 1 DIABETES
Fátima Bosch, CBATEG, UAB, Barcelona
- 12:30-13:20** PONENCIA A CONFIRMAR
Gonzalo Hortelano, U. McMaster, Ontario (Canadá)
- 13:20-13:30** COMUNICACION ORAL 1: GENE THERAPY APPROACH TO HAEMOPHILIA B TREATMENT THROUGH EPIDERMAL GRAFTS GENETICALLY MODIFIED TO SECRETE HFIX. *A. Escartí*
- 13:30-13:40** COMUNICACION ORAL 2: TRANSFERENCIA GÉNICA IN VIVO A PÁNCREAS EXOCRINO I ENDOCRINO MEDIANTE VECTORES ADENOVIRALES. *E. Ayuso*
- 13:40-13:50** COMUNICACION ORAL 3: IMPACTO DE LA TRANSFERENCIA DEL GEN WASP MEDIANTE VECTORES RETROVÍRICOS A CÉLULAS B DE PACIENTES CON EL SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH. *N. Andreu*
- 13:50-15:00** Comida
- 15:00-16:20** SESIÓN V: CÁNCER I
15:00-15:50 EL ADENOVIRUS EN TERAPIA GÉNICA Y VIRAL DEL CÁNCER
Ramon Alemany, ICO, Barcelona
- 15:50-16:00** COMUNICACION ORAL 1: ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF Ad-RB94 AND FGF-2 TARGETED-Ad-RB94 IN PANCREATIC CANCER. *J. M. Roig*
- 16:00-16:10** COMUNICACION ORAL 2: RAS-DEPENDENT ONCOLYSIS WITH AN ADENOVIRUS VAI MUTANT. *M. Cascalló*
- 16:10-16:20** COMUNICACION ORAL 3: RECOMBINANT SEMLIKI FOREST VIRUS BASED IMMUNOTHERAPY INDUCES TUMOR REGRESSION IN A MOUSE MODEL OF COLON CARCINOMA. *J. R. Rodríguez-Madoz*
- 16:20-16:40** Pausa/Café
- 16:40-18:00** SESIÓN V: CÁNCER II
16:40-17:30 INTERLEUKIN 12-BASED GENETIC IMMUNOTHERAPY FOR ADVANCED DIGESTIVE TUMORS.
Bruno Sangro. Universidad de Navarra. Pamplona.
- 17:30-17:40** COMUNICACION ORAL 4: ANÁLISIS DEL INICIO Y PROGRESIÓN DE LA LEUCEMIA MEDIANTE LA EXPRESIÓN CONDICIONAL DEL GEN BCR-ABL EN RATONES. *M. Sánchez-Martín*
- 17:40-17:50** COMUNICACION ORAL 5: EL DOMINIO DE TRANSDUCCIÓN TAT DE 8 AMINOÁCIDOS (Tat8) INCREMENTA LA EFICACIA CITOTÓXICA DEL SISTEMA HSVTK/GCV. ESTUDIO SOBRE UN MODELO DE ADENOCARCINOMA DE PANCREAS. *A. Cascante*
- 17:50-18:00** COMUNICACION ORAL 6: VACUNAS ANTITUMORALES BASADAS EN CÉLULAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE CON VECTORES NO VIRALES. *I. Moret*
- 18:00-19:00** CONFERENCIA DE CLAUSURA
Richard G. Vile. Clínica Mayo, Rochester, MN (USA)

PONENCIAS Y COMUNICACIONES ORALES

CONFERENCIA INAUGURAL

Efficient Delivery, Robust Long-Term Expression, Targeting and Exogenous Regulation of Transgenes in Vivo by Lentiviral Vectors

L. Naldini^{1,2}, M. De Palma¹, M. Venneri¹, E. Vigna¹, M. Amendola^{1,2}, F. Santoni de Sio^{1,2}, L. Ailles¹, A. Follenzi¹, A. Lombardo^{1,2}, M. Turunen¹, A.M. Turunen¹, M. Schmidt³, C. Von Kalle³

¹Institute for Cancer Research and Treatment, University of Torino, Candiolo, Italy,

²San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, Milan, Italy,

³Institute for Molecular Medicine and Cell Research, 1University of Freiburg, FRG,

To broaden significantly the applications of HSC gene therapy, the majority of transplanted HSC must be transduced, allowing for significant levels of engraftment by gene modified cells even in the absence of in vivo selection or strong conditioning regimens. Lentiviral vectors (LV) may provide a potential means to achieve these ambitious goals. Others and we previously showed that LV transduce human NOD/SCID mouse repopulating cells (SRC) by a short ex vivo incubation. Using improved vectors and optimized conditions we have now achieved highly efficient transduction of cord blood-derived SRC. The transduced SRC yielded multilineage repopulation of primary and secondary recipients while maintaining stable transgene expression. Using linear amplification-mediated PCR, we analysed the vector integration pattern in the bone marrow and CFC of the engrafted mice and showed polyclonal engraftment, propagation to secondary recipients and multilineage differentiation of individual transduced SRC. Multiple integration sites were observed in most clones. These results prove for the first time that hematopoietic progenitors with the features of self-renewing, long-term repopulating HSC can be transduced efficiently. We developed a panel of lentiviral vectors characterized by robust tetracycline regulated transgene expression. Improved versions of regulators and inducible expression cassettes were delivered by two separate vectors or by a single vector. After ex vivo transduction and transplantation of SRC, reporter gene expression could be switched “on” and “off” in human hematopoietic cells in vivo for prolonged times, showing that regulated expression of an exogenous transgene can be achieved in an in vivo model of human hematopoiesis. After systemic vector administration, regulated expression of a FIX cDNA to significant plasma levels was observed. Bone marrow-derived endothelial cell (EC) progenitors have been recently proposed to contribute to the formation of new blood vessels in tumors by a process of local vasculogenesis. By this scenario, transplantation of gene-modified marrow cells could vehicle gene therapy to the tumor and metastasis. However, to what extent the bone marrow contributes to the newly formed vessels of tumors and of other tissues is still highly debated, most likely due to the limitations of the experimental models. To address this intriguing issue, we have engineered lentiviral vectors for EC-specific expression and found that a vector containing promoter and enhancer sequences from the Tie2 gene as the most effective EC-specific vector. After intravenous delivery of the new vector into tumor bearing mice, we showed targeted expression by the new vector to tumor EC. Unequivocal identification of gene marked EC was achieved by rigorous demonstration of co-expression of the reporter and endothelial markers by cells displaying the characteristic morphology of vascular EC. Unexpectedly, by transplantation of gene-modified progenitor cells we did not observe significant contribution of the bone marrow to the EC of tumor vessels. However, we identified a population of mononuclear cells specifically expressing the new vector that homed to the tumor and closely interacted with EC in forming a vascular network at its periphery. These cells had a distinguishing phenotype and were selectively found in tumors and other sites of neovascularization, such as liver regeneration and wound healing, among a panel of host tissues. Thus, by coupling tissue-specific gene expression to cellular homing and differentiation processes, we achieved selective gene delivery and expression at sites of angiogenesis. By delivery of a suicide gene, we selectively knocked out the vector-targeted cells and found dramatic reduction of angiogenesis and inhibition of tumor growth. The cells targeted by the new vector may account for the recently reported role of bone marrow-derived cells in tumor invasion and angiogenesis, represent a potential new target for cancer drug development and provide an ideal vehicle for gene-based therapy directed to the tumor and its metastasis.

SESIÓN I. VECTORES DE TERAPIA GÉNICA

HACIA LA MAYORÍA DE EDAD DE LA TERAPIA GÉNICA NO VIRAL

Salvador F. Aliño

Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universitat de València.

La entrega celular selectiva de ácidos nucleicos con fines terapéuticos, mediante procedimientos seguros y eficaces, es uno de los objetivos principales de la terapia génica. Entendidos los ácidos nucleicos como medicamentos, debemos considerar que para que ejerzan su efecto, éstos deben encontrar la célula diana, internalizarse, alcanzar el núcleo con buena disponibilidad y expresar el gen que codifican. Pero debemos señalar que la carga negativa asociada a los grupos fosfato de cada nucleótido y el tamaño macromolecular que habitualmente presentan los ácidos nucleicos, hacen que estas moléculas sean virtualmente impermeables a las membranas biológicas y por tanto, el acceso a la célula requiere del concurso de vectores que faciliten este proceso. Clásicamente se distinguen dos grandes tipos de vectores: los virales y los no virales. Mientras los primeros aprovechan el tropismo y la capacidad de los virus para infectar células, los segundos se muestran menos eficaces pero son sistemas más seguros y pueden ser formulados con mayor facilidad como medicamentos. Las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos son ampliamente discutidos y aunque en la actualidad las ventajas de los virus en cuanto a su eficacia es indiscutible, siempre permanecen los riesgos derivados de su potencial patogenicidad. Nosotros centramos nuestra atención en el estudio y desarrollo de sistemas no virales que permitan mejorar la eficacia de los mismos. A continuación abordaremos de un lado los aspectos básicos relacionados con las ventajas alcanzadas en el desarrollo de los vectores no virales y de otro los parámetros requeridos para su utilización en estrategias terapéuticas. Desde el primer punto de vista diremos que los primeros vectores estuvieron basados en liposomas clásicos. Estos utilizan la capacidad de autoensamblamiento de los fosfolípidos para organizarse de forma micelar o en forma de bicapas, constituyendo vesículas que permiten atrapar parte del material genético en sus compartimentos acuosos. Aunque este procedimiento mostró un cierto grado de eficacia, el bajo rendimiento de encapsulación de los ácidos nucleicos, ha limitado enormemente sus aplicaciones. En contrapartida se han desarrollado otra serie de vectores basados en estructura lipídicas o poliméricas que incorporan grupos polares catiónicos con el fin de establecer complejos con el DNA en base a sus interacciones de carga. Estos sistemas basados en liposomas catiónicos-DNA (lipoplejos) o polímeros catiónicos-DNA (poliplejos) han mostrado ser mucho más eficaces que los anteriores. De un lado protegen al DNA de la degradación por las nucleasas presentes en los fluidos biológicos y por tanto confieren estabilidad al mismo, en el transcurso del proceso de transfección. De otro lado, algunos vectores incorporan nuevas propiedades, como en el caso del polímero polietilimina que actúa como una “esponja de protones”, facilitando la desestabilización del lisosoma tras el proceso de acidificación de la misma y facilitando la liberación citoplasmática del complejo y la posterior localización nuclear del DNA. La eficacia de todos estos sistemas ha sido demostrada tanto utilizando genes trazadores (proteína fluorescente verde) como en modelos experimentales que permiten evaluar el restablecimiento de funciones perdidas. Por último, otro de los requerimientos para mejorar la eficacia de los vectores no virales, es introducir elementos direccionadores que permitan transportar el complejo a subpoblaciones celulares en función de interacciones específicas ligando-receptor, mimetizando así la selectividad de las infecciones mediadas por los virus. En este sentido se han desarrollado liposomas o complejos/DNA que unen covalentemente en su superficie bien ligandos o anticuerpos con el fin de dirigir estos vectores de forma selectiva hacia receptores o determinantes antigénicos ubicados en la superficie celular, facilitando así su internalización por un mecanismo mediado por receptor. La eficacia del modelo y la selectividad de la entrega puede quedar bien reflejada mediante la utilización de genes trazadores y vectores dirigidos mediante anticuerpos monoclonales específicos o inespecíficos. Estos estudios ponen de manifiesto que solamente aquellas células que disponen de los receptores o determinantes antigénicos adecuados son transfectadas.

Junto con los avances en el desarrollo del vector en relación con la estabilidad, eficacia y selectividad mencionados anteriormente, podemos disponer también de otros parámetros que nos ayuden a definir a los vectores como medicamentos. En este sentido se han hecho esfuerzos por establecer parámetros de carácter cinético con el fin de describir la evolución temporal del vector en el organismo y su distribución en los diferentes órganos o tejidos. Sin embargo quedan por desarrollar aspectos importantes relacionados con los parámetros dinámicos, con el fin de disponer de valores objetivos que permitan describir el efecto o la acción del vector en el organismo cuando alcanza su objetivo. En este sentido hemos propuesto incorporar, en base a estudios dosis-respuesta, los conceptos de CE50 (concentración eficaz 50%) y Emax (efecto máximo) como elementos que permiten definir la potencia y/o afinidad del vector sobre el sistema celular al cual se pretende transferir los ácidos nucleicos y de otro lado definir el concepto de eficacia como el efecto máximo que es posible alcanzar en la curva dosis-repuesta.

De este modo, los resultados derivados del estudio podrían ser utilizados no sólo para comparar los diferentes vectores no virales, sino también los virales, ofreciendo una forma objetiva de valorar la bondad relativa del vector utilizado.

En las estrategias terapéuticas in vivo, surgen más cuestiones, relacionadas con la optimización de la forma medicamentosa (máxima eficacia con la mínima cantidad de medicamento), el tránsito temporal, las barreras biológicas (ejemplo, endotelios vasculares), la estabilidad de los vectores y en última instancia, la eficacia final del sistema. En este sentido, mostramos un ejemplo de cuál ha sido la evolución de la eficacia de transfección en un modelo murino de terapia génica basado en la tranferencia hepática del gen humano de la alfa-1 antitripsina, utilizando diferentes tipos de vectores no virales. En primer lugar se ha tomando en consideración que los endotelios del sinusoide hepático tienen un diámetro medio de 100nm y que por tanto

sólo los vectores con un diámetro inferior podrán alcanzar el hepatocito. En los primeros estudios valoramos especialmente la importancia del tamaño del vector en relación con la eficacia final del mismo. Utilizando liposomas clásicos y lipoplejos pudimos establecer que el diámetro del vector era un factor limitante y que la regeneración del hígado, inducida por hepatectomía parcial, incrementaba la eficacia final de la transfección. Nuevos tipos de liposomas, dirigidos mediante ligandos específicos contra el receptor de asialoglicoproteínas y/o incorporando péptidos con la secuencias de localización nuclear, ponen de manifiesto que es posible conseguir niveles plasmáticos estacionarios de la proteína humana en sangre durante periodos de tiempo prolongados, aunque estos niveles fueron cinco órdenes de magnitud inferiores a los requeridos para alcanzar concentraciones plasmáticas terapéuticas (>0.8 mg/ml). En cualquier caso, se analizaron también los hígados de los animales y el estudio molecular mostró que la amplificación por RT-PCR cuantitativo era mucho mayor en los casos en los que se había utilizado los liposomas dirigidos. Nos plantemos conocer en que medida la construcción génica o el transportador ejercían un efecto limitante en la eficacia final de este proceso. Afortunadamente, se ha descrito un procedimiento de transfección hepática in vivo muy eficiente (procedimiento hidrodinámico) que no requiere del concurso del transportador y por tanto es ideal para evaluar la importancia de la construcción génica en la eficacia de transfección. La cuestión es conocer en qué medida la estabilidad en la expresión del gen estaba condicionada por el propio vector o por la construcción génica. Se hicieron diferentes construcciones conteniendo bien el DNA genómico (con los intrones, exones y el promotor natural del gen) o bien el correspondiente cDNA controlado por diferentes promotores (natural o CMV). Los estudios iniciales pusieron en evidencia que un mes después de la transfección con 20 µg de las diferentes construcciones, los animales transfectados con la construcción conteniendo el DNA genómico alcanzaron niveles terapéuticos y prolongados en el tiempo. Los otros vectores presentaron diferentes comportamientos y aunque algunos alcanzaron niveles terapéuticos en los primeros días tras la transfección, las concentraciones plasmáticas disminuyeron con gran rapidez. Transcurridos 30 días, los animales fueron sacrificados y se valoró en el tejido hepático, la expresión del gen humano mediante RT-PCR cuantitativo, confirmando los resultados obtenidos con los niveles plasmáticos de la proteína. Con el fin de identificar en qué medida el gen exógeno humano trabajaba con eficacia, introducimos el concepto de eficacia intrínseca (iE) del gen basado en establecer un cociente entre las moléculas de mensajero producidas por molécula de gen utilizando los valores obtenidos por RT-PCR y PCR respectivamente. El estudio se realizó tanto para el gen humano (hiE) como para el gen propio del ratón (miE), pudiendo establecer así el concepto de eficacia intrínseca relativa como el cociente entre las eficacias intrínsecas del gen humano respecto al del ratón (hiE/miE), comprobando que los mejores cocientes (0.5-0.8) fueron alcanzados con el DNA genómico mientras que las otras construcciones mostraron cocientes inferiores (0.02-0.4). De otro lado, los estudios dosis-respuesta (de 0.3 hasta 300 µg/ratón) ponen de manifiesto que a partir de los 20 µg es posible alcanzar niveles plasmáticos eficaces y terapéuticos durante cuatro meses por lo menos. Hemos calculado la DE50, el Emax y estimado la distribución de las células transfectadas mediante técnicas de inmunohistoquimia, comprobando una localización principalmente perivenosa. En conclusión, podemos considerar que: i) la terapia génica no viral se muestra cada vez más como un procedimiento seguro y eficaz para su aplicación clínica; ii) la caracterización farmacológica de los vectores debe ser una condición necesaria para formular los genes como medicamentos; iii) la mejora de las propiedades de entrega del gen por parte de los transportadores contribuirá a incrementar el uso seguro y eficaz de la terapia génica.

SESIÓN I. COMUNICACIONES ORALES

Comunicación Oral 1

IMPROVED DOXYCYCLINE-DEPENDENT EXPRESSION VECTORS WITH LOW BASAL ACTIVITY AND HIGH INDUCIBILITY FOR THE SPECIFIC REGULATION OF INTERLEUKIN-12 IN THE LIVER.

Maider Zabala, Lin Wang, Cheng Qian, Jesús Prieto and M.Gabriela Kramer.

University of Navarra. Department of Internal Medicine. Division of Hepatology and Gene Therapy. School of Medicine. 31008 Pamplona, Spain.

Interleukin-12 (IL-12) has a potent antitumoral activity against hepatic tumors when it is expressed in liver for a period of time sufficiently long. Because excess of IL-12 may be toxic, long-term expression vectors allowing tight control of IL-12 synthesis are needed. The original “tet on” system is composed of a transcriptional activator protein (rtTA2S-M2) that binds to a minimal promoter in the presence of doxycycline and induces gene expression; however it has shown substantial background activity. In order to improve this system, we have substituted the minimal region of the inducible promoter for a less active sequence and we have used a set of novel chimeric liver-specific promoters to drive rtTA2S-M2. We have constructed different plasmid vectors carrying both the rtTA2S-M2 controlled by the liver promoters and the luciferase reporter gene driven by the modified inducible promoter. The resulting vectors allowed liver-specific gene regulation showing lower basal activity and higher inducibility compared to the original system. We have observed that the basal and final protein levels depend on the strength of the promoter that directs the transcriptional activator. We have selected one of these vectors to regulate IL-12 expression. Transfer of the DNA vector to mice was achieved by using the hydrodynamics-based procedure and kinetics of IL-12 production was studied in vivo. Administration of doxycycline enhanced the expression of IL-12 in a dose-dependent manner, while undetectable levels of the cytokine were observed in the non-induced status. Gene activation could be re-induced even several months after plasmid administration. Moreover, sustained continuous expression of IL-12 could be achieved with constant infusion of doxycycline. In conclusion, we describe a vector system allowing tight regulation of transgene expression in the liver for long periods of time. This system may be a valuable tool to treat neoplastic lesions and viral infections in the liver.

Comunicación Oral 2

GENERACION DE ADENOVIRUS GUTLESS “HELPER-FREE” COMO VECTORES DE TERAPIA GENICA MEDIANTE LA UTILIZACION DE LA RECOMBINASA UNIDIRECCIONAL FC31.

Raul Alba^{1,2}, Mercè Monfar^{1,2}, Fátima Bosch^{1,2} y Miguel Chillón^{1,2,3}

¹*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*

²*Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG), Universitat Autònoma de Barcelona*

³*Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA). 08193-Bellaterra. Miguel.Chillon@uab.es*

Para evitar los problemas de inmunogenicidad del adenovirus (Ad) se han generado recientemente los Ad helper-dependientes o gutless que al no tener ninguna región codificante del Ad salvaje, evita la expresión de proteínas virales y permite la utilización de insertos de hasta 36 Kb. En la producción de Ad-gutless es necesario suministrar *in trans* las proteínas necesarias para el empaquetamiento del genoma. Para ello se utilizan Ad de primera generación como helper. Para dificultar la amplificación de Ad-helper, los protocolos actuales se basan en flanquear la región de empaquetamiento Ψ del Ad-helper con secuencias loxP. La señal Ψ es posteriormente eliminada mediante la utilización de una línea celular que expresa la recombinasa Cre. Sin embargo, esta reacción es reversible porque Cre es bidireccional, lo que impide disminuir la contaminación con Ad helper por debajo del 0.1-1.0%, y hace inviable su uso en humanos. Para evitar esta contaminación proponemos utilizar una estrategia diferente basada en la recombinasa unidireccional Φ C31. Φ C31 lleva a cabo una recombinación irreversible entre una secuencia donante *attP* y otra aceptora *attB* ya que genera dos secuencias *att* nuevas (*attL* y *attR*) que no son reconocidas posteriormente por Φ C31. Esta recombinación es muy eficiente en células humanas, con una eficiencia similar a la de las recombinasas “clásicas” Cre y FLP. Ello permite la producción de Ad-gutless de calidad GMP que podrán ser utilizados en ensayos clínicos humanos. En una primera etapa hemos modificado el genoma del Ad-helper mediante la inserción de las secuencias *attB* y *attP* que flanquean la señal Ψ de empaquetamiento. Actualmente, estamos generando una línea celular que exprese Φ C31 para así eliminar la señal Ψ del Ad-helper. Tras generar Ad-gutless que contengan genes de interés, éstos se caracterizarán *in vitro* para determinar la ausencia de Ad-helper contaminantes. Posteriormente, los virus se administrarán *in vivo*, y se analizará tanto su capacidad de no inducción de la respuesta inmune celular, como la duración y nivel de expresión de los genes utilizados.

Comunicación Oral 3

USE OF SV40 RECOMBINANT VIRUSES AS VECTORS FOR GENE THERAPY.

M.Vera, G. G. Aseguinolaza, C. Rodríguez, L. Martínez, P. Berraondo, N. Razquin, D. S. Strayer, J. Prieto y P. Fortes.

University of Navarra. Department of Medicine. Irunlarrea 1. E-31008 Pamplona.

Diabetes, hypoparathyroidism, cirrhosis and others are diseases caused by a defect in the expression of secreted proteins. Also, other secreted proteins such as cytokines can play an important role in the treatment of acquired diseases such as cancer and viral infections. Recombinant viruses expressing those proteins can be used as an alternative for the treatment of these diseases. SV40 (Simian Virus 40) viruses have several advantages for this purpose. They infect resting as well as cycling cells, they have a long term expression and they are not immunogenic. We have developed a new protocol that yields high titers of T-antigen deleted non-replicative recombinant SV40 viruses (rSV40). Using this technique, we have produced recombinant viruses expressing: rat insulin-like growth factor I (SVIGFI), murine interleukin 12 (SVmIL12), murine interleukin 15 (SVmIL15), wood-chuck interleukin 12 (SVw12) and luciferase (rSVLUC) as a reporter gene. After high efficiency production, these viruses have been titered by *in situ* and quantitative PCR and assayed for recombinant gene expression. Different cell lines infected with the recombinant viruses efficiently expressed the exogenous proteins as detected by immunofluorescence. IGF-I, IL12 and IL15 were also detected in the supernatant of infected cultures by RIA and ELISA, indicating that SV40 infected cells maintain a regular secretory pathway. SV40-produced IL12 and IL15 were shown to be active by its ability to induce IFN γ production in mouse splenocytes. All these results show that recombinant SV40 vectors are able to drive the expression of secreted functional proteins, so we decided to study the efficiency of rSV40 vectors “*in vivo*”. The effect of rSVIFG-I infection has been studied in the treatment of liver cirrhosis in rats. The immune-response against HIV gp120 protein has been assayed in mice after injection of dendritic cells infected with rSVmIL12 and rSVmIL15. Subcutaneous tumours in mice have been treated with rSVmIL15 and rSVmIL12 or dendritic cells transformed with these viruses. The results of these *in vivo* studies will be presented. In general, even if further studies still have to be done, we believe that rSV40 vectors will be an efficient system to treat diseases that need a long term expression of therapeutic proteins.

SESIÓN II. NUEVAS TECNOLOGÍAS

INHIBICIÓN DE LA REPLICACIÓN DEL VIH MEDIADA POR RNAs INTERFERENTES.

Miguel Angel Martínez

Fundació irsiCaixa, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona

El silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) mediado por RNAs interferentes (RNAi) de doble cadena está emergiendo como una herramienta muy poderosa para la inhibición específica de la expresión génica. En células de mamífero, duplex de RNA de 21 nucleótidos de longitud, conocidos como siRNAs (short-interfering RNAs), inhiben eficientemente la expresión de genes endógenos y exógenos. Recientes investigaciones (revisión en Martínez et al. Trends in Immunology 2002, 23: 559), han demostrado que siRNAs dirigidos tanto contra genes virales como celulares son capaces de inhibir específicamente la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Estos resultados abren nuevas posibilidades de intervención terapéuticas frente al VIH, así como frente a otros virus RNA.

SESIÓN II. COMUNICACIONES ORALES

Comunicación Oral 1

LA ELECTROTRANSFERENCIA A MÚSCULO DE UN PREPARADO DE DNA CONJUGADO CON SP1017 AUMENTA LA EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN Y FACILITA LA DISTRIBUCIÓN DE HHGF A TEJIDOS PERIFÉRICOS DE RATA.

M. Riera^{2,3} M. Chillón^{4,5}, J.M. Aran², J.M. Cruzado³, J.Torras³, J.M. Grinyó³ C. Fillat^{1,2}

¹Programa Genes y Enfermedad. Centre de Regulació Genòmica (CRG), Barcelona.

²Centro de Genética Médica y Molecular. Institut de Recerca Oncològica (IRO).

³Lab. Nefrología Experimental. Campus Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat.

⁴Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA) and

⁵Dep. Bioquímica y Biología Molecular, Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.

La administración sistémica de proteínas terapéuticas es una aproximación común para el tratamiento de diversas enfermedades. En los últimos años la inyección intramuscular de plásmidos acompañada por un breve pulso de electroporación se ha utilizado para facilitar la transferencia génica de DNA a músculo esquelético y permitir así la producción y secreción de proteínas a niveles terapéuticos. En este trabajo hemos evaluado la capacidad de un nuevo sistema de transferencia basado en el uso de la electrotransferencia en combinación con el poloxámero SP1017 para vehicular de forma eficiente proteínas al torrente sanguíneo. En primer lugar estudiamos sus efectos directamente sobre músculo esquelético de rata. Así, pudimos observar que tras la inyección intramuscular del plásmido pCMVβ-galactosidasa conjugado con SP1017 y seguido de electroporación, la presencia de SP1017 daba lugar a un incremento muy significativo en la eficiencia de transferencia después de aplicar tanto un pulso eléctrico de 110V/cm como uno de 175V/cm. En las condiciones de alto voltaje se comprobó también que la expresión se mantenía a lo largo de los 30 días que duró el estudio. Se analizó la utilidad del sistema para la administración de proteínas secretadas y se observó que en condiciones de bajo voltaje se obtenían ya niveles plasmáticos muy elevados de fosfatasa alcalina de placenta modificada (SEAP). Posteriormente valoramos la eficacia de la estrategia para la producción del hHGF (Hepatocyte Growth Factor humano). Observamos que en las dos condiciones de electroporación el músculo de rata era capaz de producir y secretar a la circulación sanguínea hHGF durante 14 días con un pico máximo a los 5 días. El sistema fue más eficiente tras la aplicación de un alto voltaje. El análisis de distribución de la proteína en los tejidos periféricos permitió detectar hHGF en hígado, y también en riñón y pulmón.

En resumen, nuestros resultados indican que el poloxámero SP1017 aumenta la expresión de los genes electrotransferidos y que este sistema de transferencia podría ser un método eficiente para la producción sistémica de proteínas terapéuticas.

Comunicación Oral 2

INHIBITING EXPRESSION OF SPECIFIC GENES IN MAMMALIAN CELLS USING MODIFIED U1 snRNPS

Puri Fortes¹, Miguel Angel Zaratiegui¹, Maria Vera¹, Gloria Aseguinolaza¹, Nerea Razquin¹, Yolanda Cuevas¹, Fei Guan², Peng Liu³, Jesús Prieto¹, David Rowe³, Samuel I. Gunderson²

¹ University of Navarra. Department of Medicine. Irunlarrea. Pamplona E-mail: pfortes@unav.es.

²Rutgers University, Piscataway, New Jersey

³University of Connecticut, Farmington, USA

Gene expression inhibitory techniques can be used for gene function analysis or to block the expression of toxic genes, like viral genes or oncogenes. Antisense technologies using oligonucleotides or ribozymes have been widely used as inhibitory techniques, but their success has been limited. Recently, new inhibitory techniques have been described, like RNA interference. However, reducing or eliminating expression of a given gene is likely to require multiple methods to ensure that any gene can be inhibited in a given cell. Therefore, we have developed a novel method to specifically inhibit gene expression in mammalian cells using modified U1 snRNA. U1 snRNAs designed to basepair near the polyadenylation signal of the target gene-'s pre-mRNAs, block their 3'end processing, resulting in degradation of the target mRNAs and, therefore, inhibition of gene expression. A set of rules that allow an easy use of this technique have been determined, studying inhibition of reporter genes. The target genes should have a AAUAAA type of polyadenylation sequence to be susceptible to U1 snRNA inhibition. Also, U1 snRNA should basepair with non-structural sequences of the terminal exon. Two U1 snRNAs basepaired to different sequences in the same target pre-mRNA act synergistically, resulting in up to 700-fold inhibition of the expression of specific reporter genes.

Modified U1 snRNAs have also been used to inhibit the expression of endogenous mammalian genes. The inhibition can be obtained by transiently- or stably-expressed modified U1 snRNAs. Inhibitions of up to 25 fold have been obtained for osteocalcin, collagen 1A, lamin A/C, human aryl sulphatase and others. The high levels of inhibition obtained, indicate that the use of modified U1 snRNAs is an efficient method for blocking gene expression both to be used on its own or in combination with other inhibitory techniques.

Comunicación Oral 3

TERAPIA GÉNICA DE PIEL:

GENERACIÓN DE UN VECTOR LENTIVIRAL PARA LA EXPRESION INDUCIBLE DE PROTEÍNAS EN PROCESOS DE CICATRIZACIÓN CUTÁNEA

Marcela Del Rio, María J Escamez, Marta García, Angel Ramirez, JL Jorcano y Fernando Larcher.

Proyecto de Daño, Reparación e Ingeniería Tisular en Epitelios. CIEMAT y Fundacion Marcelino Botín

La estimulación de la cicatrización de heridas crónicas como las úlceras vasculares requiere la expresion de factores que mejoren tanto la reepitelización como la remodelación del estroma. En virtud de la naturaleza del proceso de cicatrización, la expresion de tales proteínas con acción pro-cicatrizante, debe ser transitoria. Estrategias de terapia génica, tales como el uso de vectores adonovirales, pueden ser empleados a este fin. Sin embargo, las frecuentes recidivas en este tipo de lesiones complican esta aproximación. La existencia de secuencias reguladoras de la expresion génica epidérmica que se activan en procesos de cicatrizacion como el promoter de la queratina K6 (Ramirez y cols. PNAS 92:4783-4787, 1995) permite un abordaje terapéutico "a demanda". En este trabajo hemos desarrollado un vector lentiviral portador del promotor inducible de la queratina K6 dirigiendo la expresion de la proteína verde fluorescente (GFP) con el que se modificaron genéticamente keratinocitos humanos. Ensayos de cicatrización in vivo en pieles regeneradas en ratones inmunodeficientes a partir de los queratinocitos modificados con el vector lentiviral demostraron la inducibilidad de expresion y por tanto la validez de la aproximación para su empleo con proteínas de relevancia terapéutica en cicatrización.

SESIÓN III. SIMPOSIO. CÉLULAS MADRE

HEMATOPOIESIS, STEM CELLS AND STEM CELL FATE DECISIONS IN MURINE MODELS

Stefan Karlsson, MD, PhD

Molecular Medicine and Gene Therapy, Lund University Hospital

BMCA12, 221 84 Lund, Sweden

Hematopoietic stem cells develop in the yolk sac and intraembryonally during development and migrate to the fetal liver to expand and differentiate into hematopoietic progenitors and mature progeny cells. Postnatally, hematopoiesis occurs mainly in the bone marrow and to a certain extent in the spleen of mice. Hematopoiesis is a highly ordered and hierachial process originating with hematopoietic stem cells that have the capacity to self-renew and differentiate into more restricted progenitors like the common myeloid progenitor and common lymphoid progenitor which subsequently differentiate into myeloid and lymphoid progenitors with more restricted lineage potential. Hematopoietic stem cells have several fate options, including the nondividing state (quiescence), self-renewal, differentiation, apoptosis and migration. The fate decisions are controlled by external and internal (autocrine) growth factor signals, transcription factors, cell adhesion molecules and cell cycle regulators. Of major interest for the development of cell and gene therapy using hematopoietic stem cells (HSCs) is the ability to understand the mechanisms that control self-renewal of HSCs, both ex vivo and in vivo. It is considered that a balance of active stimulators and inhibitors control HSC fate in the bone marrow, i.e. control whether a given HSC is quiescent or divides. This control is important to allow adequate number of blood cells to be formed at any one time and simultaneously guard that HSCs do not undergo unregulated growth that may lead to malignant transformation with leukemia as a consequence. Expansion of HSCs ex vivo has been considered a desirable goal to develop better bone marrow transplantation protocols and to generate cycling HSCs as preferable targets for retroviral vectors in gene therapy protocols. Therefore, we have developed transgenic and knockout mouse models that remove or add molecules that act as cell cycle stimulators or inhibitors in order to gain understanding of how growth regulation of HSCs is controlled in the bone marrow. From these findings, we hope to gain insights into how stem cells can be safely expanded ex vivo in cell expansion and gene therapy protocols. To this end, we have generated mice that lack receptors for TGF- β , a negative regulator of hematopoietic cell proliferation. Similarly, we have generated mice that lack the HoxB4 transcription factor gene which has recently been reported to expand murine HSCs 40 fold ex vivo after overexpression following gene transfer. We have studied the hematopoietic system carefully in these animals and find that TGF- β signaling by itself does neither alter the cell cycle distribution of HSCs nor alter the regeneration capacity of HSCs following bone marrow transplantation. HoxB4 deficiency leads to mild hypocellularity in the hematopoietic organs and slower kinetics of HSC cycling upon proliferative demand. Cumulatively, our findings show that many regulatory signals are required to control self-renewal of HSCs and that removal of one negative regulator or one positive regulator, has an effect, but a limited effect. Therefore, detailed understanding of all regulatory circuits that regulate HSC proliferation is required in order to develop safe and efficient protocols for stem cell expansion and gene therapy of HSCs.

GENE THERAPY OF INHERITED SKIN BLISTERING DISEASES.

Guerrino Meneguzzi

INSERM U385, Faculty of Medicine, Nice, France.

Studies on gene therapy of genodermatoses have been limited to junctional epidermolysis bullosa (JEB), lamellar and X-linked ichthyosis. These conditions offer unique opportunities to develop strategies for corrective gene delivery because no effective treatment is available even though their etiopathogenesis is well defined. Furthermore, their recessive transmission requires delivery of one copy per cell of the curative transgene, the involved genes are transcribed as rather short RNA messengers and the corresponding cDNAs can be accommodated in existing viral vectors. Genetic correction of JEB was first achieved in vitro using keratinocytes from patients lacking expression of one of the three chains of laminin-5. Gene correction has been shown to fully restore the cell adhesion machinery and stably maintain the high proliferative and clonogenic potential of epithelial stem cells that grafted into immune deficient mice regenerate firmly adhering epithelia. These results demonstrated the feasibility of phenotypic reversion of adhesion-defective epithelial cells. At present, the first phase I/II clinical trial of *ex vivo* gene therapy in selected JEB patients is ongoing in Italy. Progress in genetic correction of the dystrophic forms of EB (DEB) is at earlier stage. Indeed, gene therapy of genodermatoses is limited by the availability of vectors able to accommodate and transfer large cDNAs. Since MoMLV retroviruses are the most used vectors for gene therapy, we assessed their suitability to correct the genetic defect of keratinocytes of patients with recessive DEB (RDEB). RDEB is an inherited skin blistering disorder due to mutations in collagen VII that assembles into the anchoring fibrils of the papillary dermis. The collagen VII cDNA (9 kb) cloned into a pLZRS retrovirus backbone was transduced into primary collagen VII-null RDEB keratinocytes and fibroblasts. The highly efficient gene transfer resulted in secretion of the recombinant polypeptide that displayed the structural properties of the wild-type collagen VII. The transduced keratinocytes lost the hypermotility characteristic of the RDEB cells, and efficiently deposited immunoreactive collagen VII at the dermal-epidermal junction of transplantable ex-vivo reconstructed skin. The artificial skin grafted onto SCID mice generated a basement membrane with mature hemidesmosomes and anchoring fibrils. This approach of genetic therapy was validated in a spontaneous animal model of RDEB dog in which mutated collagen VII molecules are expressed and assembled in abnormal anchoring fibrils. Ex vivo transduction of the dog RDEB keratinocytes with MoMLV retroviruses expressing the dog wild-type collagen VII cDNA and construction of artificial skin using the infected cells demonstrated the stable reversion of the RDEB phenotype. Our results demonstrate that the currently utilized retroviral vectors efficiently transfer the large collagen VII cDNA into primary RDEB keratinocytes and produce transplantable epithelia permanently expressing the curative transgene. They also open new perspectives for the use of retroviral vectors in the transfer of genes encoding large polypeptides.

SESIÓN III. COMUNICACIONES ORALES

Comunicación Oral 1

CORRECCIÓN GENÉTICA DEL DEFECTO HEMATOPOYÉTICO EN RATONES DEFICIENTES EN EL GEN DE ANEMIA DE FANCONI A.

Río P¹, Segovia JC¹, Hanenberg H², Casado, JA¹, Van de Vrugt HJ³, Arwert F³, Joenje H³ y Bueren JA¹.

¹Terapia Génica de la Hematopoyesis, CIEMAT/Fundación Marcelino Botín, Madrid, Spain;

²Dept. of Pediatric Hematology and Oncology. Children’s Hospital, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Alemania;

³Department of Clinical Genetics and Human Genetics, Free University Medical Center, Amsterdam, Holanda.

La generación de ratones deficientes en el gen de anemia de Fanconi A ha permitido estudiar la similitud entre el modelo murino y la enfermedad en humanos, y analizar la utilidad de la terapia génica para la reversión del defecto hematopoyético observado en estos ratones. *In vitro*, las células de la médula ósea (MO) de ratones Fanca^{-/-} mostraron una alta susceptibilidad a agentes entrecruzantes del DNA, como la Mitomicina C (MMC) y una deficiente capacidad de expansión en presencia de factores hematopoyéticos, con incremento en el porcentaje de células apoptóticas y un significativo cambio en el patrón de diferenciación (Río et al.Blood 100:2032, 2002). Mediante ensayos *in vivo* hemos observado también una deficiente funcionalidad del compartimento de células madre hematopoyéticas de ratones Fanca^{-/-}. Una vez descritas estas simiilitudes entre el fenotipo hematopoyético en el modelo de ratón y la enfermedad en humanos, quisimos revertir dicho fenotipo mediante la utilización de vectores retrovirales. Células Lin⁺Sca-1⁺, enriquecidas en precursores y células madre hematopoyéticas, procedentes de la MO de ratones Fanca^{-/-} se purificaron y transdujeron con vectores retrovirales que codificaban el gen terapéutico *FANCA* humano y la proteína verde fluorescente como gen marcador (LFAPEG). Las células Fanca^{-/-} transducidas con el vector LFAPEG revertieron la hipersensibilidad a MMC. Además, las células corregidas presentaron una capacidad de expansión *in vitro* similar a las células control. Los estudios *in vivo* demostraron la capacidad de células Fanca^{-/-} transducidas de reconstituir la hematopoyesis de ratones letalmente irradiados y mostraron una ventaja selectiva *in vivo* frente a las células no corregidas en presencia de MMC. Nuestros datos demuestran en el modelo murino que la terapia génica con vectores retrovirales es una alternativa eficaz para corregir defectos hematopoyéticos asociados a la Anemia de Fanconi.

Comunicación Oral 2

CAPACIDAD HEMATOPOYÉTICA DE CÉLULAS MUSCULARES Y SU APLICACIÓN EN TERAPIA GÉNICA

M. Ramírez², P. Río¹, J.A. Bueren¹, J.C. Segovia¹.

¹Proyecto de Terapia Génica de la Hematopoyesis. CIEMAT/Fundación M. Botín Madrid.

²Unidad de Investigación del Hospital Niño Jesús. Madrid.

La capacidad de células obtenidas de tejidos no hematopoyéticos, tales como el músculo esquelético, para repoblar la hematopoyesis a largo plazo de receptores mielosuprimidos ha sido descrita recientemente, sugiriendo que otros tejidos, considerados como no hematopoyéticos podrían actuar de reservorio de células madre hematopoyéticas. Con la intención de evaluar la capacidad hematopoyética de células musculares, suspensiones unicelulares de los cuádriceps y tibiales anteriores de ratones congénicos Ly-5.1 se trasplantaron en ratones congénicos Ly-5.2, letalmente irradiados, junto con 2x10⁵ células de médula ósea Ly-5.2 de soporte. Los ratones trasplantados se analizaron periódicamente mediante extracción de sangre y análisis del porcentaje de células Ly-5.1⁺. Los niveles de reconstitución observados fueron dependientes de dosis, con porcentajes que llegaron hasta el 12% cuando se trasplantaron 2x10⁷ células musculares. Para estudiar la procedencia de las células residentes en el músculo con capacidad de repoblación hematopoyética, células Lin⁺Sca-1⁺ de médula ósea fueron infectadas *in vitro* con un vector retroviral que expresa la proteína verde fluorescente (EGFP), seleccionadas mediante citometría de flujo y trasplantadas en ratones congénicos. A los tres meses post-trasplante se extrajeron la médula ósea y el músculo esquelético de los ratones receptores y se analizaron mediante citometría de flujo. Alrededor del 1% de las células musculares expresaron la EGFP y fueron capaces de generar hematopoyesis en receptores secundarios. El análisis clonal de estas células en comparación con células de la médula ósea del mismo animal se encuentra en marcha en la actualidad. En conclusión, células residentes en el músculo esquelético tienen capacidad de repoblación hematopoyética a corto y a largo plazo. Además, la reconstitución hematopoyética de receptores mielosuprimidos con células primitivas Lin⁺Sca-1⁺ también genera la repoblación del músculo esquelético. La existencia de un posible reservorio de células madre hematopoyéticas en tejidos no hematopoyéticos abre la posibilidad de su utilización en enfermedades que cursen con aplasia medular, tales como la Anemia de Fanconi.

Comunicación Oral 3

“CYTOKINE-HUMANIZED” IMMUNODEFICIENT MOUSE FOR HUMAN NEO-ORGAN FORMATION by LENTIVIRAL VECTOR MICROINJECTION OF SINGLE CELL EMBRIOS

I.Punzón , L.M.Criado, F.Serrano & A.Bernad

Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología. Madrid, Spain

I.P. and L.M.C. equally contributed to this study F.S. and A.B. share senior authorship

Human embryonic/adult stem cell research lacks an adequate xenotransplant model where stem cell-derived neo-organ formation can be assayed. This neo-organ formation may be dependent of a "humanized" stem cell microenvironment where the human stem cells can find niche to differentiate. The NOD/scid mouse strain is the best recipient of human tissues. Research on hematopoietic stem cell transplantation has shown the strength and limitations of the hemopoietic neo-organ formation in this mouse. For instance, species cross reacting cytokines allow human cells to migrate to murine bone marrow and initiate a partial differentiation program but there is no formation of mature blood cells. If non-cross reacting human cytokines are administered differentiation proceeds. Thus, we have started a program to "humanize" the cytokine microenvironment of NOD/skid mouse. Since conventional microinjection techniques often fail in this strain, we have investigated lent viral-mediated gene transfer in embryos. We use lent viral vectors with the fluorescent protein (EGFP) as a reporter gene. The virus is concentrated and injected into the zone pellucidae of single-cell embryos, which are then implanted into the uterus of females. We observed GFP expression in embryos inoculated and in the transgenic progeny with a >30% efficiency. Expression is maintained for the two generations analyzed so far. This new technique of transgenesis is a powerful method to obtain expression of human protein in mouse. Different microinjections with human cytokine-coding lentivirus have been done with the ultimate goal of making a mouse to produce human blood. The outcome of these transgenic experiments will be discussed.

SESIÓN IV. ENFERMEDADES HEREDITARIAS Y METABÓLICAS

GENE THERAPY FOR TYPE 1 DIABETES

Fatima Bosch, Alex Mas, Eduard Ayuso, Miguel Chillón, Joel Montane, Assumpció Bosch, Judith Agudo, Mónica George, Virginia Haurigot & Pedro Otaegui

Dept. Biochemistry & Mol. Biology and Center of Animal Biotechnology and Gene Therapy. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra, Spain.

Type 1 diabetes results from autoimmune destruction of the insulin-producing β -cells. Patients are identified after diabetes onset when β -cell destruction is nearly complete. Insulin replacement therapy allows diabetic patients to lead active lives, but it is imperfect due to failure in maintaining proper glycemic control. Most patients develop microvascular, macrovascular and neurological complications. To counteract hyperglycemia gene therapy approaches using surrogate cells to deliver insulin are being developed. However, recovery from type 1 diabetes requires β -cell regeneration from islet cell precursors and prevention of recurring autoimmunity. Adult islet cells are constantly replaced by a slow turnover from a few islet cells that maintain replicative capacity and from duct stem cells that differentiate into endocrine cells. Growth factors that induce β -cell regeneration and prevent autoimmune destruction of new islets might reverse type 1 diabetes. Expression of IGF-I in β -cells of streptozotocin-treated transgenic mice counteracts cytotoxicity and insulinitis. These mice gradually normalized all metabolic parameters and survived. This was paralleled by increased β -cell mass through neogenesis and β -cell replication. Presently, we are developing gene therapy approaches for diabetes by genetic manipulation of skeletal muscle (“replacement” therapy) and pancreas (“regeneration” therapy). Our main objectives are: 1) To study the skeletal muscle capacity to decrease diabetic hyperglycemia by producing mature insulin and increasing glucose uptake. 2) To establish a new therapeutical approach to type 1 diabetes by endocrine pancreas regeneration. To this end, studies are carried out: a) in transgenic animal models, b) in diabetic mice after insulin and/or glucokinase gene transfer to skeletal muscle by viral (AAV) and non-viral (electrotransfer of naked plasmid DNA) vectors, c) in mice and dogs after transferring marker and therapeutic genes to pancreatic islet cells *in vivo* using adenoviral vectors. The results obtained will be discussed.

Supported by CICYT (SAF99-0094), FIS01/0427 and LaMaratoTV3 Foundation, Spain.

SESIÓN IV. COMUNICACIONES ORALES

Comunicación Oral 1

GENE THERAPY APPROACH TO HAEMOPHILIA B TREATMENT THROUGH EPIDERMAL GRAFTS GENETICALLY MODIFIED TO SECRETE hFIX.

A. Escart³, M. del Rio^{1,2}, F. Larcher^{1,2}, J.I. Jorcano^{1,2}, F.Serrano³, A.Bernad³

¹Project of Cell and Molecular Biology and Gene Therapy. CIEMAT. Avenida Complutense 22, E-28040 Madrid, Spain

²Fundacion Marcelino Botín for Gene Therapy.

³Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología. Madrid, Spain

Haemophilia B is an X linked recessive bleeding disorder caused by a deficiency in blood clotting factor IX (FIX). Patients suffer from severe bleeding episodes and are currently treated by intravenous administration of recombinant factor IX. Patients require regular injections throughout their lifes. It is hoped that gene therapy will provide a novel avenue for permanent cure for haemophilia.

Haemophilia has a number of characteristics that are likely to facilitate the development of a gene transfer approach to treatment: 1) Biologically active clotting factors can be synthesized in many different cell lines (myoblasts, hepatocytes, primary fibroblasts...); 2) A wide therapeutic window, since factor levels as low as 1.5% of normal are likely to improve the clinical symptoms of the disease, and levels of 100% are still within normal limits; 3) There are animal models (genetically engineered mice and naturally occurring dog models); 4) Circulating levels of clotting FIX are easy to measure and correlate well with clinical manifestations of the disease.

The aim of this project is to obtain hFIX secreting epidermal grafts. We are investigating the use of human keratinocytes as potential target cells for gene therapy for haemophilia B. We are also improving classical retro and lentiviral based vectors in order to increase as much as possible the FIX protein production per cm² of cultured cells.

Different cell lines such PDVC 57 (epidermal murine), HaCat (epidermal human), HepG2 (human hepatocytes) and primary keratinocytes (human) were transduced in culture with Moloney-based oncoretroviral and HIV-based lentiviral bicistronic vectors. These vectors contain the coding region from factor IX cDNA and the intron 1 splicing sites (which have been reported to improve expression in the context of this retroviral vectors). We have used the EGFP/EYFP as reporter genes. Transduced populations secrete hFIX in supernatant as measured by a hFIX ELISA assay. The expression of the EGFP/EYFP enables us to select the positive population avoiding those cells which have not been transduced. This selection ensures that the engraftment will only be made with keratinocytes expressing human factor IX. Diverse vector modifications to increase secretion are discussed. A human epidermal/dermal equivalent composed of a hFIX secretory epidermis will be grafted into immunodeficient mice to measure hFIX level.

Comunicación Oral 2

TRANSFERENCIA GÉNICA IN VIVO A PÁNCREAS EXOCRINO I ENDOCRINO MEDIANTE VECTORES ADENOVIRALES.

Eduard Ayuso^{1,4}, Miguel Chillon^{2,4}, Fèlix García³, Judith Agudo^{1,4}, Virginia Haurigot^{1,4}, Assumpció Bosch^{1,4}, Ana Andaluz³, Pedro Otaegui^{1,4}, & Fàtima Bosch^{1,4}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,

²Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA),

³Departamento de Cirugía y Sanidad Animales

⁴Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193-Bellaterra. fatima.bosch@uab.es

La diabetes tipo 1 es el resultado de la destrucción autoinmune de las células β del páncreas. La regeneración del páncreas endocrino podría revertir la enfermedad. Sin embargo, la manipulación genética *in vivo* del páncreas supone una gran limitación. Por ello, en nuestro laboratorio hemos desarrollado diferentes técnicas para dirigir la expresión de genes exógenos a páncreas *in vivo*. Se usaron vectores adenovirales que expresan el gen de la β -galactosidasa bajo la acción del promotor CMV. En primer lugar, realizamos un clamp circulatorio en ratones para conseguir un *bypass* hepático, y se inyectaron los adenovirus por la vena yugular. Mediante esta técnica se consigue mantener los niveles de virus en circulación más tiempo y se aumenta la infección de tejidos extrahepáticos. Así, conseguimos infectar tanto el páncreas exocrino como los islotes pancreáticos de los animales tratados sin riesgo de pancreatitis, que es el inconveniente principal de los métodos actuales. A diferencia del ratón, el páncreas de perro es de tamaño, estructura y vascularización similar al humano. Por ello, en perros beagle realizamos un clamp circulatorio que afectaba únicamente al páncreas, aislándolo así de la circulación general. Posteriormente, inyectamos los adenovirus en la arteria o la vena pancreático-duodenal, y después de finalizar el tiempo de clamp, fueron eliminados mediante una bomba de extracción, consiguiendo reducir la carga viral total. Mediante esta técnica conseguimos infectar gran parte del páncreas exocrino, páncreas endocrino y conductos pancreáticos. Por tanto, hemos conseguido la expresión de genes de interés en páncreas de perro in vivo. Estas nuevas técnicas de transferencia génica permitirán el desarrollo y aplicación de nuevas aproximaciones de terapia génica para la diabetes mellitus. Este estudio está financiado por La Fundación de La Marató de TV3 y FIS (01/0427).

Comunicación Oral 3

IMPACTO DE LA TRANSFERENCIA DEL GEN WASP MEDIANTE VECTORES RETROVÍRICOS A CÉLULAS B DE PACIENTES CON EL SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH.

Nuria Andreu¹, Josep M. Aran ², Xavier Estivill ¹ y Cristina Fillat¹

¹Programa Genes y Enfermedad. Centre de Regulació Genòmica (CRG), Barcelona

² Centre de Genètica Mèdica i Molecular, Institut de Recerca Oncològica (IRO), L'Hospitalet de Llobregat.

El síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X, debida a mutaciones en el gen WASP. La clínica de la enfermedad cursa con trombocitopenia, eccema e infecciones recurrentes. La afectación es en muchos casos severa y sin un tratamiento adecuado la esperanza de vida se limita a la primera década. El trasplante alogénico de médula ósea es el único tratamiento eficaz si bien existe la dificultad de encontrar un donante histocompatible. Los resultados prometedores alcanzados con el trasplante sugieren que la terapia génica a precursores hematopoyéticos sería un sistema potencialmente eficaz para el tratamiento de la enfermedad. La función normal de las células linfoides es el principal problema en los individuos afectados. Por ello, el objetivo del presente trabajo ha consistido en evaluar el impacto de la transferencia del gen WASP a células B de pacientes WAS portadores de las mutaciones R86H y E133K. Dichas mutaciones se seleccionaron en base a la variabilidad en la expresión fenotípica de la enfermedad. Así, pacientes con la mutación R86H, que expresan la proteína WASP mutada, poseen un fenotipo moderado; mientras que individuos portadores de la mutación E133K, en los que no se detecta la proteína WASP, cursan con un fenotipo severo. Para valorar la efectividad de la de la terapia génica de WASP en primer lugar se generó un vector retroviral recombinante que contenía el cDNA de WASP (pLHWSN). Células B inmortalizadas con el virus de Epstein-Barr (EBV) de pacientes portadores de las mutaciones R86H y E133K se transdujeron con el vector retroviral pLHWSN. La expresión del gen WASP transferido a dichas células se identificó mediante *Western blot* e inmunocitoquímica. El estudio de los cambios fenotípicos asociados a la transferencia génica permitió determinar que las células B transducidas presentaban un incremento en la polimerización de F-actina citoplasmática. Además se pudo comprobar que dichas células respondían al estímulo con bradiquinina formando proyecciones de actina. También se identificó que dichas células recuperaban la capacidad formadora de podios. Estos resultados sugieren que la transferencia del gen WASP a células linfoides de pacientes WAS sería capaz de corregir al menos algunas de las principales alteraciones fenotípicas asociadas.

SESIÓN V. CÁNCER I

EL ADENOVIRUS EN TERAPIA GÉNICA Y VIRAL DEL CÁNCER

Ramon Alemany

Grupo de Terapia Génica y Viral del Cáncer

La terapia génica del cáncer presenta requisitos diferenciales respecto a la terapia génica de otras enfermedades. Su objetivo es eliminar las células del tumor con la máxima eficacia in vivo. Bajo estos condicionantes el adenovirus se ha destacado como vector protagonista. Se han empleado múltiples estrategias basadas en distintos tipos de genes terapéuticos y, en general, los resultados clínicos se han visto limitados por una transducción insuficiente del tumor inyectado. Por otra parte, la viroterapia emplea virus de replicación selectiva en tumores y podría paliar esta limitación. La similitud entre una infección adenoviral y el cáncer han propiciado el uso de adenovirus en viroterapia. La replicación se controla con promotores específicos de tumor o con deleciones de funciones virales que son prescindibles en la célula tumoral. Además la cápside del adenovirus se modifica genéticamente para eliminar su hepatotropismo y conseguir dirigirla al tumor. De este modo se busca dotar al adenovirus de las propiedades de distribución sistémica, especificidad y amplificación terapéutica propias del sistema inmune. Finalmente se prevé que la combinación de terapia génica y viroterapia en vectores adenovirales de replicación selectiva aumente la selectividad y eficacia de estos nuevos agentes antitumorales.

SESIÓN V. COMUNICACIONES ORALES

Comunicación Oral 1

ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF Ad-RB94 AND FGF-2 TARGETED-Ad-RB94 IN PANCREATIC CANCER

Josep M Roig¹, Meritxell Huch², Miguel A Molina¹, Uwe Wirtz³, Sunil Sreedharan³, Cristina Fillat², Adela Mazo¹

¹University of Barcelona, Barcelona.

²Center for Genomic Regulation, Barcelona.

³Titan Pharmaceuticals Inc, South San Francisco, CA

Pancreatic cancer is the fifth leading cause of cancer deaths in Europe and North America. New diagnostic tests and treatments for this neoplasia including strategies based on gene transfer are urgently needed. One promising gene for the treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma is an N-terminal truncated variant of the retinoblastoma (RB) gene product, termed RB94. Previously, we demonstrated that adenovirus-mediated RB94 (Ad-RB94) gene delivery inhibits pancreatic tumor cell growth by causing cell cycle accumulation in S/G2, and inducing tumor cell apoptosis. Although adenovirus-mediated gene delivery is very efficient, clinical use is hindered by the lack of specificity for the tumor tissue due to inadequate cellular expression of the CAR adenoviral receptor, the large numbers of virus necessary to reach adequate levels of gene transfer, and high liver tropism due to the high expression of CAR on hepatocytes. Fibroblast growth factor receptors (FGFRs), particularly the FGFR-1 subtype, is overexpressed in pancreatic carcinoma. Therefore, we have redirected Ad-RB94 to FGFRs using a bifunctional reagent consisting of a FGF-2 molecule linked to a Fab fragment against the adenovirus knob region, to overcome these problems. Initial experiments were performed using an adenovirus carrying b-GAL as reporter gene. In all the human pancreatic tumor cell lines tested, the levels of FGFR expression correlated with the expression levels of transduced b-GAL gene. When Ad-RB94 was used under similar conditions, FGF-2 retargeting increased both the levels of the RB94 protein and tumor cell sensitivity to its antiproliferative effects. A significant enhancement of the cell cycle accumulation at S/G2 and the induction of tumor cell apoptosis were observed in the two human pancreatic cancer cell lines with high levels of FGFRs (NP-9 and Panc-1). Moreover, in vivo studies using Panc-1 xenografts in nude mice showed that intratumoral retargeting significantly enhanced the induction of apoptosis by Ad-RB94, which correlated with a higher inhibition of tumor growth in treated animals. In summary, retargeting via FGFRs enhances Ad-RB94 uptake by human pancreatic cancer cells, and consequently increases the potency of the therapy. FGF2-Fab-Ad-RB94 is a promising therapy for the potential clinical use in treating patients with pancreatic cancer.

Comunicación Oral 2

RAS-DEPENDENT ONCOLYSIS WITH AN ADENOVIRUS VAI MUTANT.

¹Manel Cascalló, ¹Gabriel Capellà, ²Adela Mazo, and ¹Ramon Alemany.

¹Laboratori d’Investigació Translacional, Institut Català d’Oncologia, Barcelona, Spain

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Barcelona , Barcelona, Spain.

Adenovirus synthesize proteins that interact with oncogene and tumor suppressor gene products to set the cell for virus replication. Mutant viruses defective in these functions replicate selectively in cancer cells and represent new tools to treat cancer. We report a selectivity strategy based on deletions of adenovirus Virus-Associated (VA) RNAs. In normal cells these RNAs are necessary for virus replication because they inactivate the RNA-dependent protein kinase PKR, a kinase that otherwise would block protein translation in response to infection. However, downstream effectors of Ras can also inactivate PKR and therefore the need for VA RNA genes should be bypassed in cells with an active Ras pathway. We demonstrate here that a VAI RNA mutant presents a Ras-dependent replication and can be used for oncolytic virotherapy of pancreatic tumors.

Comunicación Oral 3

RECOMBINANT SEMLIKI FOREST VIRUS BASED IMMUNOTHERAPY INDUCES TUMOR REGRESSION IN A MOUSE MODEL OF COLON CARCINOMA.

Juan R. Rodríguez-Madoz, Ignacio Melero, Jesús Prieto, and Cristian Smerdou.
Unidad de Terapia Génica, Universidad de Navarra. Pamplona, Spain

Two Semliki Forest Virus (SFV) based vectors expressing murine interleukin-12 (IL-12) have been developed and their antitumoral efficacy has been tested in a mouse model of colon carcinoma. In one of the vectors (SFV IL-12), genes coding for IL-12 p35 and p40 subunits were cloned under a single viral subgenomic promoter using an IRES between them. A second vector (SFV enhIL-12) carries each gene fused to the SFV capsid translation enhancer, under independent viral subgenomic promoters. Recombinant SFV viral particles from both vectors were produced and IL-12 expression was tested in supernatants of BHK infected cells by ELISA. IL-12 was expressed at 9 µg/10⁶ cells from SFV IL-12 vectors and at 85 µg/10⁶ cells from SFV enhIL-12, indicating a correct function of the translation enhancer. In both cases the protein was biologically active as shown by the induction of IFN§ in murine splenocytes incubated with supernatants from infected BHK cells. Single tumor nodules were implanted in the flank of C57BL/6 mice by subcutaneous injection of MC38 colon carcinoma cells. These nodules were treated with a single intratumoral injection of SFV IL-12, SFV enhIL-12, and SFV LacZ or saline as controls. Injection of vectors encoding IL-12 resulted in both cases in a significant inhibition of tumor growth in a dose-dependent manner. With a dose of 10⁸ viral particles more than 80% of treated mice experienced a complete tumor regression with long-term tumor-free survival. However, when lower doses of vector were used SFV enhIL-12 was more efficient than SFV IL-12 in inducing antitumoral responses, indicating that the IL-12 amount expressed in the tumor is important for its therapeutic activity. In addition, all mice that rejected the tumors showed a specific protection against tumor rechallenge. CTL assays and depletion studies showed that this response was CD8⁺ T cell dependent. In animals treated with IL-12 expressing vectors high cytokine levels were found in the tumors at 24 h. postinjection (2,5 ng IL-12/mg protein for SFV IL-12 and 14,4 ng IL-12/mg protein for SFV enhIL-12) but decreasead along time until day 6. A similar result was found in serum although the cytokine levels were much lower. These data show that alphavirus vectors can be useful to enhance antitumor immunity by local delivery of functional cytokines, such as IL-12.

24 | II REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE TERAPIA GÉNICA

SESIÓN V: CÁNCER II

INTERLEUKIN 12-BASED GENETIC IMMUNOTHERAPY FOR ADVANCED DIGESTIVE TUMORS.

Bruno Sangro, Guillermo Mazzolini, Juan Ruiz, Maite Herraiz, Ignacio Herrero, Jorge Quiroga, Alberto Benito, Javier Larrache, Jesús Pueyo, José Carlos Subtil, Iosu Sola, Belén Sádaba, Ignacio Melero, Cheng Qian, Jesús Prieto.

Dptos. de Medicina Interna, Aparato Digestivo, Radiología, Anatomía Patológica y Farmacología Clínica. Clínica Universitaria y Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra. Pamplona.

Digestive malignancies are a major cause of cancer-related death in the world that frequently involve the liver and are poorly sensitive to chemotherapy. Primary and secondary liver tumors are also poorly immunogenic, but different strategies involving immune stimulation have shown occasional activity against colorectal cancer or hepatocellular carcinoma. Interleukin-12 (IL-12) is a heterodimeric soluble cytokine mainly produced by antigen presenting cells, that induces specific T helper type 1 and cytotoxic responses. IL-12 has shown remarkable properties as an anti-cancer agent when administered as a recombinant protein. In the recent years, gene therapy has emerged as a promising approach to treat cancer by restoring the function of tumor suppressor genes, selectively activating prodrugs inside tumor cells or stimulating immune response against neoplastic tissue, and gene transfer has been successfully achieved in humans, using viral and non-viral vectors. We and others have reported that intratumoral administration of an adenoviral vector carrying the IL-12 genes generates a strong systemic therapeutic effect in several models of metastatic digestive tumors, including hepatocellular carcinoma and colorectal cancer. This anti-tumor activity involves an immune response mediated by T and NK cells as well as an anti-angiogenic effect. We have also shown that there is a wide heterogeneity in the toxicity to systemic adenoviral gene transfer of IL-12. We now report the results of the first clinical trial evaluating this strategy for the treatment of advanced digestive malignancies in humans. Ad.IL12 is a first-generation, replication-defective adenoviral vector that expresses the human IL-12 gene under the control of the strong, non-selective cytomegalovirus promoter. Biological activity of human IL-12 secreted by HepG2 and PLC/PRF/5 cells transduced with Ad.IL12 was confirmed by ELISA.

We performed an open-label, non-randomized, dose-escalation phase I trial in which Ad.IL12 was administered intratumorally to patients with advanced primary liver cancer, colorectal cancer (CRC) or pancreatic cancer (PC). The primary endpoint of the study was to assess the feasibility and safety of single and repeated direct intratumoral injections of Ad.IL12, and to determine the maximal tolerated dose. Secondary aims were to determine biological effects and the evaluation of anti-tumoral activity. Patients were enrolled consecutively in 7 cohorts of 3 patients with a dose-escalation plan ranging from 2.5·1010 vp to 3·1012 vp.

Ad.IL12 was administered under US, CT scan or endoscopic US guidance in one single tumor location. The viral dose corresponding to each cohort was thawed and diluted in saline to a final volume of at least 20% of the volume of the lesion to be injected. Twenty-one patients were enrolled between May 2001 and January 2002. Mean age was 55 years (ranging from 37 to 70 years) and 62% of patients were males. Eight patients had HCC, 7 had PC, 5 had CRC, and 1 had cholangiocarcinoma, and all of them had multiple tumor masses. All the patients were fully ambulatory. Six out of the 8 patients with HCC had an underlying liver cirrhosis of viral origin due to hepatitis C virus (4 cases) or hepatitis B virus (2 cases). All cirrhotic patients had portal hypertension and a fairly preserved liver function. Most patients were heavily pretreated but none had received anti-neoplastic chemotherapy or immunosuppressant drugs in the month previous to Ad.IL12 injection. Intratumoral injection of Ad.IL12 was feasible in 100 % of cases. Forty-four injections were administered to the 21 patients, mainly into a liver tumor nodule. Seventy percent of the injection procedures were finished within 60 minutes after vector thaw.

Patients were closely followed during the first 10 days by daily evaluation of toxicity and a comprehensive set of laboratory tests. At day 10, a tissue sample was obtained from the injected lesion. At day 30, toxicity was reevaluated and response to therapy was assessed using WHO criteria. If at that time tumor disease was stable or responding and no serious adverse reactions had been observed, a second dose was administered into the same nodule. The whole procedure was repeated but no more than 3 doses of Ad.IL12 could be administered to the same patient. Patients were followed monthly until month 6 and every 3 months thereafter.

A total of 319 adverse events were recorded throughout the follow-up period, mostly related to disease progression. Overall, Ad.IL12 administration was well tolerated and dose-limiting toxicity was not observed even at the highest dose delivered. Frequent adverse reactions included mild to moderate fever occasionally associated with profuse sweating and malaise, pain or skin reaction at the site of injection, nausea and/or vomiting, lymphopenia and thrombocytopenia. Regarding liver toxicity, most patients had altered liver function tests of varying degrees before treatment but relevant changes in serum transaminases or alkaline phosphatase consistent with a reaction to Ad.IL12 were not observed. There was no hint of long-term toxicity among patients followed for more than 6 months.

Immunological disturbances and autoimmunity were two major concerns at the beginning of the trial. The number and nature of infectious episodes recorded were those expected in the population studied. Regarding autoimmunity no clinical manifestations of autoimmune reactions were observed despite the fact that serum autoantibodies (particularly anti-smooth muscle and antinuclear antibodies) became detectable frequently or showed an increase of their pre-existing titer.

A biological response to therapy was examined by evaluating transgene expression, tumor infiltration by immune effector cells and delayed cellular response to tumor antigens. No significant changes in the circulating levels of IL12 were found but serum IFN-g peaked at day 1 in a dose-dependant manner, probably due to adenoviral infection itself. In 4 out of 10 evaluable cases there was a substantial increase in the tumor infiltration by CD4 and CD8 cells. Delayed-type hypersensitivity skin tests against tumor extracts were negative before treatment and remained negative at day 30 after the first Ad.IL12 injection in all patients.

In every patient, viral DNA was detected in serum 5 minutes after the end of Ad.IL12 injection and then progressively disappeared. Although there were marked differences from one patient to another, those that received doses of Ad.IL12 ≥ 5·1010 vp showed a more intense and durable presence of viral DNA in their blood. Regarding other body fluids, low amounts of viral DNA were detected in saliva, urine, and stools mostly from patients receiving higher doses. There was no correlation between titers of anti-adenoviral antibodies and intensity and duration of circulating viral DNA, or viral shedding into other body fluids. However, both the level and persistence of viral DNA in serum were reduced after the first injection in those patients receiving multiple doses of Ad.IL12.

Although clinical efficacy was not a primary endpoint, response to therapy was evaluated by imaging techniques at day 30 after the last dose of Ad.IL12 in all but two patients with PC. A partial response was observed in a patient with abdominal lymph nodes and lung metastases from a resected HCC. According to tumor type, disease progressed during therapy in 3 out of 5 patients with either CRC or PC but in 1 out of 8 HCC. Disease stabilization was not observed more frequently among patients receiving the highest doses of Ad.IL12.

In conclusion, we have shown for the first time that repeated intratumoral injections of a first-generation adenoviral vector encoding IL-12 can be safely administered to patients with advanced digestive cancer (including subjects with underlying compensated liver cirrhosis). This therapy did not induce significant control of tumor growth in most cases. The low anti-tumoral effect might be due to poor transduction of the tumor mass and to short duration of transgene expression. In the future, gene therapy clinical trials should benefit from imaging studies to allow visualization of gene expression in the neoplastic tissue to assess the transduction power of a particular vector for a specific type of tumor. Now, the efficacy of Ad.IL12 should be tested in homogenous series of patients with a small tumor burden where immune stimulation is more likely to be effective against malignant cells.

Barcelona, 28-29 DE MARZO DE 2003 | 25

Comunicación Oral 4

ANÁLISIS DEL INICIO Y PROGRESIÓN DE LA LEUCEMIA MEDIANTE LA EXPRESIÓN CONDICIONAL DEL GEN BCR-ABL EN RATONES.

M. Sánchez-Martín¹, N. Gutiérrez-Cianca¹, A. Rodríguez-García¹, A. Gutiérrez-Adán², B. Pintado² and I. Sánchez-García¹

¹Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC), Centro de Investigación del Cáncer, CSIC/ Universidad de Salamanca, Campus Unamuno, SALAMANCA, (SPAIN).

²Area de Reproducción Animal, Centro de Investigación y Tecnología, Madrid.

La consecuencia más frecuente de las traslocaciones cromosómicas en el cáncer humano es la fusión génica. La traslocación t(9;22)(q34;q11) puede dar lugar a la proteína *BCR-ABLp190* (p190) que se asocia a LLA-B. Los modelos de ratón clásicos han demostrado la capacidad tumorigénica de estos genes de fusión pero no han permitido estudiar cuestiones de gran relevancia en el cáncer humano, debido a que no permiten modular la expresión génica, como por ejemplo, el papel de estos genes de fusión en el inicio y el mantenimiento del tumor o la influencia de la cantidad de producto de fusión en el desarrollo tumoral. Por esta razón, hemos desarrollado un sistema de regulación de la expresión génica basado en el operón de resistencia a tetraciclina de E.coli que reúne en un única unidad transcripcional todos los elementos necesarios para modular la expresión del gen de fusión p190. Este sistema nos ha permitido desarrollar un modelo de ratón fisiológicamente relevante (CombitAp190), que expresan el gen de fusión de manera dependiente de la adición de doxiciclina en el agua de bebida. Utilizando este modelo hemos podido responder cuestiones de enorme trascendencia para el entendimiento del cáncer y su tratamiento: i) la expresión del gen de fusión durante el desarrollo embrionario es capaz de iniciar la leucemia; ii) una vez iniciado el tumor, el mantenimiento del mismo es independiente del p190 ya que impone a la células un destino tumoral, cuestionando su utilización como dianas terapéuticas.

Comunicación Oral 5

EL DOMINIO DE TRANSDUCCIÓN TAT DE 8 AMINOÁCIDOS (Tat8) INCREMENTA LA EFICACIA CITOTÓXICA DEL SISTEMA HSVTK/GCV. ESTUDIO SOBRE UN MODELO DE ADENOCARCINOMA DE PANCREAS.

Anna Cascante, Cristina Fillat

Programa Genes y Enfermedad. Centre de Regulació Genòmica (CRG).Barcelona

La efectividad de la terapia génica en cáncer depende en gran medida, de la capacidad de vehicular los genes candidatos a un número suficiente de células tumorales. La utilización de gnes suicidas como el gen de la timidín quinasa del virus herpes (HSVtk) en combinación con ganciclovir (GCV), aportan una ventaja adicional respecto a otros sistemas al disponer de un mecanismo citotóxico amplificador denominado efecto adyacente. Aún así el sistema es limitado. Recientemente se han descrito algunos péptidos (PTD) *protein transduction domains* capaces de transportar las proteínas fusionadas a través de las membranas biológicas. El objetivo del presente trabajo ha consistido en potenciar la acción citotóxica del sistema HSVtk/GCV, sobre un modelo de adenocarcinoma de páncreas, mediante la transferencia del gen HSVtk fusionado al dominio de transducción Tat8. Células NIH3T3 transfectadas con el gen Tat8L/TK presentaronn una sensibilidad 5 veces mayor al tratamiento con GCV cuando se comparaba con células transfectadas con el gen TK. Experimentos de cocultivo dirigidos a evaluar la magnitud del efecto adyacente permitieron comprobar que, en condiciones en las que únicamente un 1% del cultivo expresaba el gen Tat8/TK, el tratamiento con GCV resultaba en una viabilidad celular del 50%. Este efecto se observó en condiciones en las que no había contacto celular, sugiriendo por tanto que el efecto adyacente observado no estaba mediado por las uniones *gap* sino que se producía a través de la biodistribución de la proteína Tat8/TK. El análisis *in vivo* se realizó en tumores derivados de la línea celular pancreática NP-18 y desarrollados en el tejido subcutáneo de ratones atímicos. Experimentos preliminares indican que tumores inyectados con células que expresan Tat8/TK y tratados posteriormente con GCV durante 15 días experimentan un notable efecto citotóxico que conlleva una remisión completa del tumor en un 40% de los casos. Estos resultados sugieren que la modificación del gen HSVtk mediante la fusión al dominio Tat8 podría constituir una prometedora estrategia para optimizar la terapia génica con genes suicidas.

Comunicación Oral 6

VACUNAS ANTITUMORALES BASADAS EN CÉLULAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE CON VECTORES NO VIRALES

Inés Moret Tatay^a, Isaias Sanmartin^a, Antonio Crespo^a, Francisco M. Marco^b, Joaquín Díaz^b y Salvador F. Aliño^a.

^aDpto. de Farmacología, F. de Medicina, Universitat de Valencia.

^bA.S.A.C. Pharmaceutical International A.I.E. Alicante, España.

La administración de vacunas puede permitir la estimulación del sistema inmune contra la vacuna y también contra las enfermedades con origen común a la vacuna. Cuando se utilizan como vacunas células tumorales modificadas genéticamente para producir citoquinas e irradiadas, se podría evitar el desarrollo de tumores si se consigue, al utilizar las vacunas, la estimulación del sistema inmune contra las células que darían lugar al tumor. Esta estimulación se realizaría a través de los antígenos marcadores tumorales presentes en las vacunas y en las células tumorales, y además por la producción por parte de la vacuna de determinadas citoquinas. En el presente trabajo se demuestra que la producción de la citoquina GM-CSF por parte de las células tumorales empleadas en la vacunación, tras ser transfectadas con los complejos no virales de DOTAP/plásmido-GM-CSF e irradiadas, consigue la estimulación del sistema inmune que inhibe el crecimiento de tumores implantados. En un modelo de melanoma murino se administraron diferentes dosis (0.2 y 2 millones/ratón/dosis) implantándose posteriormente el tumor con 100.000 células tumorales. Empleando como vacuna 2 millones de células por ratón se ha obtenido que el 100% de los ratones sobreviven al implante del tumor, y con la dosis de 0.2 millones la supervivencia alcanzada ha sido del 20%, indicando una dosis-respuesta en el efecto antitumoral de las vacunas. Además, también se obtiene retraso en el desarrollo de los tumores cuando transcurridos 7 meses de la vacunación a los ratones supervivientes al primer implante de tumor, se les administra un segundo implante quedando una supervivencia final del 20%, y del 100% si se administra una dosis de vacuna previa a la reimplantación del tumor. El rechazo del tumor está mediado por un incremento de IgG2a y de IgG3 pero no de IgG1, cuando los valores obtenidos por inmunodifusión radial se comparan con el grupo control. Los mayores niveles de citoquinas mediante RT-PCR cuantitativa han sido obtenidos para las citoquinas IL-4 e IFN-γ. Con todos estos resultados se demuestra que la vacunación basada en células irradiadas y modificadas genéticamente para producir GM-CSF mediante vectores no virales, evita el desarrollo de tumores en el 100% de los ratones al emplear dosis de 2 millones/células/ratón.

26 | II REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE TERAPIA GÉNICA

CONFERENCIA DE CLAUSURA

Gene and Immunotherapy for Cancer

A. Ahmed, G. Daniels, R.M. Diaz, M. Gough, I. Hennig, D. Jevremovic, T. Kottke, J. Moreno, F. Neczyporenko, K. Olivier, V. Phan Lai, J. Qiao, D. Riddle, L. Sanchez Perez, L. Sanz Alcober, K. Suzuki, U. Thanarajasingam, J. Thompson, R. Vile.

Molecular Medicine Program, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

There are currently no vector systems available which are efficient, or targeted enough to transduce all of the tumor cells in a patient with even a single copy of a therapeutic gene. Ideally, therefore, the genes used for gene transfer therapy of cancer should be able to achieve two major goals. The first is to kill tumour cells locally with high efficiency. The second is to stimulate potent anti tumour immunity such that distant metastases, to which genes cannot be delivered, can also be eradicated. We have recently shown that transfer of a novel class of cytotoxic gene, encoding viral fusogenic membrane glycoproteins (FMG), provides a new approach to cytoreductive gene therapy for cancer. Cytotoxicity results from the generation of large multinucleated syncytia when transduced cells expressing the FMG fuse with neighboring cells that express the appropriate viral receptor. We have demonstrated that the biochemical mechanisms by which cancer cells are killed is of considerable importance to the subsequent immunogenicity of that death. In general terms, cell death by the highly ordered process of apoptosis escapes detection by the immune system and is actually immunosuppressive. In contrast, cancer cell death through non-apoptotic (necrotic/oncotic) mechanisms is pro-inflammatory and has the potential to prime antitumor immune responses. Our results show that fusion of cells through expression of viral FMG leads to non-apoptotic cell death that is highly immunostimulatory and which may be valuable in the development of novel protocols for the loading of dendritic cells ex vivo for production of cancer vaccines. We have also described a novel, FMG-based genetic method by which tumor cell/dendritic cell hybrids may be prepared, which clearly differentiates fusion from aggregation and which can be used to purify the hybrids from unfused and aggregated cells. Using this method of fusion induction, we identified a novel class of hybrids deriving principally from short lived, small (2-4 nuclei) hybrid cells. These hybrids are very potent in presenting tumor antigens to T cells, traffic from subcutaneous injection sites to draining lymph nodes and are potent immunogens in vivo.

The ability to target gene expression to tumor cells is also an essential prerequisite for safe and effective gene therapy of cancer where protocols involving direct delivery of vectors to accessible tumors are involved. We have adopted several different approaches, including both transcriptional targeting as well as the use of cell based carriers to chaperone precious stocks of vectors to the tumour site before release. Most of the clinical trials of *in vivo* gene delivery have been disappointing in terms of the levels of transduction of human tumours. Significant advances are, therefore, required to make gene therapy a realistic prospect for cancer treatment. Acceptance of this has led to advocacy of the use of replicating viruses for delivery to both local and disseminated tumors. In particular, conditionally replication competent adenoviral vectors offer the chance to combine several different levels of both targeting and therapeutic approaches. In this respect, our laboratory has recently described two different conditionally replication competent adenoviral vector systems, in which expression of the essential viral E1A gene is controlled either by pharmacological induction, or is targeted to tumor cells which over-express activated RAS oncoproteins. In summary, our long-term objective is to develop effective gene therapies for the treatment of malignancy. We have focused both on the **discovery** of novel genes able to kill tumor cells locally with concomitant activation of specific immune effector cells and on the development of **efficient and targeted** vectors for the delivery of such genes directly to tumors growing *in situ*.

Barcelona, 28-29 DE MARZO DE 2003 | 27

COMUNICACIONES PÓSTER

SESIÓN I. COMUNICACIONES PÓSTER

Comunicación Póster 1

ENGINEERING TUMOR SPECIFIC REPLICATING ADENOVIRUSES AS THERAPEUTIC AGENTS FOR TREATMENT OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC)

Sergja Bortolanza, Pilar Marrades, Helena Villanueva, Bruno Sangro, Gabriela Kramer, Jesús Prieto, Rubén Hernández-Alcoceba, Cheng Qian

Division of Hepatology and Gene Therapy, Department of Medicine, School of Medicine and Clinica Universitaria, University of Navarra, Pamplona, Spain.

Background and aims: Low permissiveness of solid tumors to adenoviral vectors is a limitation for gene therapy. Tumor-specific replicating viruses may overcome this hurdle by inducing the transduced tumor cells to release progeny virions that would infect neighboring cells facilitating the spread of the vector within the tumor tissue.

Methods: We constructed a recombinant adenovirus where the E1A promoter was substituted by the telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter, a sequence which is silenced in normal cells but active in 85% of malignancies. The replication of this adenovirus (AdTE1) and its lytic activity in tumor cells were assayed in different telomerase positive hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines and telomerase negative fibroblasts. Wild-type adenovirus (WT-Ad) and E1 deleted adenovirus (AddelE1) have been used as positive and negative controls.

Results: After infection with AdTE1, E1A expression could be detected only in telomerase positive HCC cells, but not in telomerase negative fibroblast. Infection of HCC tumor cells with AdTE1 lead to active adenoviral replication and tumor cell death even at low moi of infection. This level of replication was comparable to that induced by WT-Ad. On the contrary, no cytopathic effect nor production of virions were observed in telomerase negative fibroblasts after infection with AdTE1. On the other hand, AddelE1 was unable to replicate or cause cytopathic effect in any of the cell types studied.

Conclusions: Tumor specific replicating adenoviruses can be engineered by replacement of E1A promoter by a tumor specific promoter. In order to increase the cancer specificity of these virus, this strategy can be complemented with the introduction of mutations in the E1A gene that prevent binding of the protein to pRB. A tumor-specific replicating adenovirus carrying the cytokine interleukin-12 is under investigation, as well as the animal model necessary to evaluate simultaneously the replication of adenovirus and the effect of immunotherapy.

Comunicación Póster 2

GENE DELIVERY BY TRANSFERRIN AND ASIALOFETUIN-LIPOPLEXES IN THE TREATMENT OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Tros de Ilarduya C. ¹, Arangoa MA.², Düzgüne_ N.³ and Qian C.⁴

¹ Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Navarra, Pamplona, Spain.

² CINFA Laboratories, Pamplona, Spain.

³ Department of Microbiology, University of the Pacific, San Francisco, CA 9415, USA.

⁴ Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Navarra, Pamplona, Spain.

The use of gene therapy with immunostimulatory cytokines to enhance immunologic responses against tumor cells has emerged as a promising new approach to treat unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). Specific targeting to the liver has been achieved by using ligands that bind the asialoglycoprotein receptor (ASGPr), which is uniquely present on hepatocytes in large numbers with high-affinity binding. Asialofetuin (AF), a glycoprotein having triantennary galactose terminal sugar chains, is known as an excellent ligand molecule selectively recognized by ASGPr. In this study we have evaluated the efficacy of a non-viral gene delivery system (AF-lipoplexes) carrying interleukin 12 (IL-12) gene to treat experimental liver cancer. At the same time, transferrin-lipoplexes were also prepared and tested in order to study the effect of a non-specific ligand attached to liposomes in the treatment of tumors.

The experiments were carried out with DOTAP/cholesterol liposomes (1:0.9 molar ratio). Complexes for in vitro experiments were prepared at 4/1(+/-) lipid/DNA charge ratio, by sequentially mixing the liposomes with the ligands and adding plasmid pCMVLuc. Complexes for systemic or intratumoral gene delivery were prepared at 5/1 (+/-) charge ratio and contained 0.5 mgAF/mg DNA (pMV100-mouse IL-12, pCMVLuc or pCMV-GFP). HepG2 (human hepatoblastoma), HeLa (human cervix carcinoma), BNL (mouse hepatocellular carcinoma) and CT26 (mouse colon carcinoma) cells were transfected and after 48 hours luciferase expression was measured. Transfection activity in vitro in HepG2 and BNL cells resulted in an increased gene expression by AF-lipoplexes. A competitive inhibition experiment was performed in HeLa cells, which are deficient in ASGPr. No differences were observed with complexes in the presence or absence of the ligand, supporting the hypothesis that targeted complexes are recognized by the ASGPr.

Individual female Balb-c (8-10 weeks of age) mice were injected via the tail vein with 60 mg of pCMVLuc or pCMV-GFP. Twelve hours after injection the animals were sacrificed and the expression of luciferase and GFP in the liver was determined. The in vivo efficiency of transfection to the liver by injecting AF-lipoplexes was also improved. The efficacy of transferrin and asialofetuin-complexes was also evaluated in a murine HCC model based on subcutaneous implantation of liver tumor cells (BNL) and colon tumor (CT26). Tumors with an average size of 7 mm in diameter were treated with the mentioned formulations by intratumoral injections. The administration of AF-lipoplexes containing IL-12 plasmid to HCC tumors resulted in a peak of serum IL-12 with the highest value after 6 hours. The production of IFN-g presented a similar profile. The therapeutic gene induced a tumor regression in the animals 7 days after therapy. Animal survival improved also considerably. Similar results were obtained by using transferrin-lipoplexes in the case of colon tumors based in the CT26 model. The synthetic nature of this system provides the potential of flexibility in terms of composition and the capability of inexpensive and large scale production of complexes.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge María Buñuales and Elisa Jiménez for the help in this work. The project was supported by a grant from the Government of Navarra (Department of Education), The Echebano Foundation and the University of Navarra.

Comunicación Póster 3

CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE FGF EN TUMORES DE ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS. ENSAYO DE LA EFICACIA CITOTÓXICA DE VECTORES ADENOVIRALES CON TROPISMO REDIRIGIDO A FGFR.

Meritxell Huch¹, Miguel Angel Molina², J.M. Roig², Adela Mazo², Cristina Fillat¹

¹Programa Genes y Enfermedad. Centre de Regulació Genòmica (CRG).

²Dep. Bioquímica y Biología Molecular. Universitat de Barcelona.

El adenocarcinoma de páncreas ductal es un tumor altamente agresivo cuya práctica identidad entre incidencia y mortalidad pone de manifiesto que se trata de una neoplasia con una prognosis muy negativa. Estos datos justifican, sin duda, la búsqueda de nuevos tratamientos de mayor eficacia terapéutica. La transferencia de genes con capacidad de inducir la muerte de la célula tumoral de forma selectiva constituye una prometedora estrategia terapéutica. Entre los sistemas estudiados para redirigir adenovirus a poblaciones celulares específicas destaca la conjugación del virus con el ligando FGF-2. Con ello se consigue bloquear el tropismo natural del virus y redirigirlo específicamente hacia células que expresan los receptores de FGF de alta afinidad. El objetivo del presente trabajo ha sido estudiar el patrón de expresión de los receptores de FGF en tumores pancreáticos y valorar la eficacia citotóxica del sistema suicida Citocromo P4502B1 (CYP2B1)/ciclofosfamida (CPA) vehiculizado mediante vectores adenovirales conjugados con FGF-2. El estudio de la expresión de receptores de FGF se realizó tanto en líneas celulares, como en tumores desarrollados en ratones y en muestras tumorales procedentes de pacientes. El análisis por inmunofluorescencia, utilizando distintos anticuerpos anti-FGFR reveló una elevada expresión de los receptores en la línea celular PANC-1. En cambio, se observaron niveles muy reducidos de expresión en las células NP-18. Resultados similares se obtuvieron a partir del análisis inmunohistoquímico de tumores desarrollados en el tejido subcutáneo de ratón. El estudio de la expresión de FGFR-1 en tumores de pacientes permitió concluir que existía sobreexpresión de FGFR1, principalmente en la membrana apical y el citoplasma de las células ductales, en la mayoría de muestras estudiadas. Sin embargo se observó una gran variabilidad interindividual en los niveles de expresión. La transducción de la línea tumoral PANC-1 con adenovirus no modificados y adenovirus-FGF2-Fab’ que expresan el gen CYP2B1 y posterior tratamiento con CPA permitió comprobar que el efecto citotóxico era significativamente más elevado en aquellas condiciones en que el virus utilizado estaba complejado con FGF-2. Estos resultados sugieren que la combinación AdCYP2B1-FGF-2-Fab’/CPA constituiría una prometedora estrategia terapéutica para un subgrupo de pacientes con tumores que sobreexpresen niveles significativos de FGFR.

Comunicación Póster 4

A COMPARISON OF TARGETING PERFORMANCE OF ONCORETROVIRAL VS LENTIVIRAL VECTORS ON HUMAN KERATINOCYTES

Fernando Serrano^{3,*}, Marcela Del Rio^{1,2,*}, Fernando Larcher^{1,2,*}, Marta Garcia^{1,2}, Evangelina Muñoz^{1,2}, María José Escamez¹, Marta Muñoz, Alvaro Meana⁴, Antonio Bernad³ and José Luis Jorcano^{1,2}

¹Project of Cell and Molecular Biology and Gene Therapy. CIEMAT. Madrid, Spain

²Fundacion Marcelino Botín for Gene Therapy.

³Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología. Madrid, Spain

⁴Centro de Transfusiones del Principado de Asturias, Oviedo, Spain

* Fernando Serrano, Marcela Del Rio and Fernando Larcher contributed equally to this study

The epidermis, like other rapidly-renewing tissues, relies on a stem cell compartment to undergo constant regeneration. In order to develop realistic and long lasting therapeutic approaches for some skin disorders, gene transfer to these critical cells must be obtained. While efficient retroviral *ex vivo* targeting and transgene integration in human keratinocytes is tightly dependent on proliferation, transferring genetic information to quiescent cells in culture also presents advantages, including the possibility of targeting putative dormant epidermal stem cells. In the present study we compared the efficiency of transduction achieved with a third-generation of HIV-based lentiviral vector to that obtained with a Moloney murine leukemia oncoretroviral vector (MLV) on proliferating and quiescent human keratinocytes growing *in vitro* in standard Rheinwald and Green cultures as well as in confluent organotypic cultures. Each viral vector contained the enhanced green fluorescent protein (EGFP) as a reporter gene. The lentiviral vector, but not the MLV vector, led to EGFP expression both in non-dividing and proliferating epidermal cell populations *in vitro*. This feature was clearly evident when direct targeting of human keratinocytes, forming part of the epidermal component of an organotypic skin culture, was attempted. Keratinocytes modified by both MLV and the lentiviral vector allowed long-term regeneration of genetically engineered human skin on the backs of immunodeficient NOD/SCID mice. However, EGFP transgene expression in the context of the MLV (LTR-driven) or lentiviral vector (CMV-driven) demonstrated clear differences both in quantitative terms and in the in vivo localization pattern.

Comunicación Póster 5

GENERATION AND COMPARATIVE STUDY OF SEMLIKI FOREST VIRUS NON-CYTOPATHIC VECTORS

Cristian Smerdou, Nerea Razquin, Yolanda Cuevas, Juan R. Rodríguez Madoz, y Jesús Prieto.

Unidad de Terapia Génica, Universidad de Navarra, Pamplona.

Alphavirus vectors have a great potential in the field of gene therapy, since they can express high levels of recombinant therapeutical proteins in many different tissues. Expression of heterologous proteins from alphavirus vectors is transient, due to the cytopathic nature of viral replication. This could be an important drawback for the use of these vectors in gene therapy applications where a sustained expression of the transgene is desired. To circumvent this problem several alphavirus mutants with reduced cytopathogenicity have been obtained both from Sindbis virus, and more recently from SFV. All these mutations have been located in the nsp2 subunit of the viral replicase suggesting that cytopathogenicity could be related to replicase processing. In order to compare these mutants we have constructed several SFV vectors containing the mutations already described for this virus, as well as those described for Sindbis virus, by introducing the latter in conserved positions in SFV. We have also constructed new vectors containing mutations that affect processing of the replicase. In all cases we have studied their cytopathogenicity and expression level in BHK cells, as well as their packaging capacity, as will be discussed. Surprisingly, mutations previously described in SFV do not abolished its cytopathogenicity and diminished drastically packaging of the vector in viral particles. However, two mutations based on Sindbis virus produced an interesting phenotype in the context of SFV. One of this mutants, (G1E in nsp2), continued to be cytopathic, but gave rise with a relatively high frequency to non-cytopathic variants by natural selection. The second mutant (P718T in nsp2) was apparently not able to replicate in most cells, but also gave rise with a relatively high frequency to non-cytopathic variants, able to form colonies in the absence of selection. We believe that these noncytopathic variants contain additional mutations which are presently being characterized.

Comunicación Póster 6

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EFICACIA DE DIFERENTES VECTORES RETROVIRALES PARA DIRIGIR LA EXPRESIÓN DE UN TRANSGÉN EN LINFOCITOS T HUMANOS

Elena Almarza, José C. Segovia, Paula Río, Juan A. Bueren y María L. Lamana.

Proyecto de Terapia Génica de Hematopoyesis CIEMAT/Fundación Marcelino Botín. Madrid.

Con objeto de seleccionar vectores retrovirales que faciliten la elevada expresión de transgenes de aplicación clínica en linfocitos T humanos, estamos realizando un estudio con vectores que expresan únicamente un gen marcador - el gen de la proteína fluorescente verde (EGFP) - bajo el control del promotor viral. Con objeto de independizar el nivel de expresión del transgén respecto al número de copias que se han integrado en las células diana, éstas se infectan a diferentes multiplicidades de infección con cada uno de los vectores retrovirales. Posteriormente, los niveles de expresión del transgén - analizados mediante la intensidad media de fluorescencia - se compara entre los cultivos que contienen una proporción similar de células transducidas. En la actualidad hemos comparado la eficacia de dos vectores en donde la EGFP se expresa bajo un promotor quimérico derivado del SFFV (SF1-EGFP cedido por J. Barquinero y SF11-EGFP) y un vector el promotor del virus MoMuLV (PRV-EGFP cedido por A. Bernad). Linfocitos T humanos obtenidos de sangre periférica fueron **transducidos con tres ciclos de infección** después de activación con hrIL-2, antiCD3i y antiCD28i y en presencia de fibronectina (Lamana et al. Journal of Gene Medicine. 3. 32-41; 2001). **Dos días después del último ciclo de infección**, las células se analizaron en las condiciones descritas. Los linfocitos transducidos con los vectores SF1-EGFP y SF11-EGFP expresaron niveles similares de fluorescencia verde. Sin embargo, la transducción con vectores PRV-EGFP facilitó la expresión de niveles de fluorescencia **verde que fue** significativa y sistemáticamente superior a la observada en células transducidas por SF1-EGFP y SF11-EGFP. En la actualidad tres nuevos vectores retrovirales están en estudio, con objeto de seleccionar el vector de mayor eficacia para expresar genes suicidas, genes marcadores y genes terapéuticos en linfocitos T humanos.

Comunicación Póster 7

INCORPORACIÓN DE UNA SECUENCIA DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR A UN VEHÍCULO RECOMBINANTE NO VÍRICO PARA TERAPIA GÉNICA

Anna Arís y Antonio Villaverde

Institut de Biotecnologia i de Biomedicina y Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona.

Los aminoácidos 126-135 del antígeno T del virus SV40 han sido descritos como una señal de localización nuclear eficiente cuando se presenta en proteínas recombinantes. Este péptido ha sido insertado en dos sitios aceptores alternativos de un enzima β-galactosidasa de *Escherichia coli* llamado 249AL, que a la vez presenta un dominio de unión a DNA, un motivo de unión e internalización celular basado en el reconocimiento de integrinas αvβ3 y una secuencia de localización nuclear críptica presente de forma natural en el enzima bacteriano. *In vitro*, la presencia del péptido de SV40 mejora la eficiencia de transferencia génica mediada por 249AL hasta treinta veces. Sin embargo, los niveles de expresión de DNA se encuentran altamente influenciados por el sitio de inserción y a la vez por el impacto estructural que ocasiona la acomodación del péptido heterólogo en el vector. La estabilidad estructural de la proteína híbrida, aparentemente crítica en la transferencia dirigida de DNA, es evaluada en el contexto de las proteínas quiméricas recombinantes como vectores no víricos en terapia génica.

Comunicación Póster 8

DESARROLLO DE UN VECTOR MULTICOMPARTIMENTAL BASADO EN LIPOSOMAS Y POLIPLEJOS ADN/PEI : EL LIPOPOLIPLEJO

Isaías Sanmartín Santos^a, Inés Moret Tatay^a, Antonio Crespo^a, Oriol Massó^b, Jaime Piulats^b y Salvador F. Aliño^a.

^aDpto. de Farmacología, F. de Medicina, Universitat de Valencia.

^bMerck Farmaquímica SA.

Las vacunas génicas no celulares contra el cáncer más eficaces ensayadas en la actualidad se basan en el empleo simultáneo de uno o más antígenos antitumorales combinados con ADN que codifica para citoquinas u otras moléculas inmunoestimulantes. Frecuentemente no se dispone de los genes que codifican estos antígenos, por lo que se purifican e incorporan como tales en la vacuna. Sin embargo, estas moléculas son de naturaleza química diversa, y en ocasiones la combinación de antígenos seleccionada para nuestro sistema de vacunación es químicamente incompatible entre sí, no siendo posible su asociación. Nuestro laboratorio ha desarrollado sin embargo un nuevo modelo de vehiculización de antígenos basado en dos compartimientos diferentes, lipídico e hidrosoluble, asociados a un tercer compartimento de transporte de ácidos nucleicos. Este nuevo modelo de vehículo de transporte constituye un sistema de vacunación versátil que posibilita la administración conjunta de diversas combinaciones de moléculas biológicas, que serían incompatibles entre sí en otros complejos de vacunación. El lipopoliplejo permite la incorporación de antígenos lipídicos en la bicapa liposomal, antígenos hidrosolubles en el interior del liposoma; y de ácidos nucleicos en forma de poliplejos ADN:PEI. Se prepara a partir de dos subsistemas, lipídico y polimérico, que se elaboran independientemente. Estos subsistemas se elaboran según las técnicas habituales de encapsulación de liposomas y formación de poliplejos, y posteriormente se hacen interaccionar entre sí formando un “lipopoliplejo”. Para su análisis, se propone un método rápido y sencillo, basado en la disociación específica de las diferentes estructuras del complejo, con el detergente Triton X100 para el componente lipídico, y el polímero aniónico heparina para el poliplejo ADN:PEI. El lipopoliplejo se forma a partir de liposomas SUV (SM:CH:DP) que encapsulan la sonda fluorescente carboxifluoresceína. Los componentes del lipopoliplejo se visualizan por electroforesis en gel de agarosa en presencia de bromuro de etidio bajo iluminación por luz ultravioleta. En conclusión, los lipopoliplejos representan un nuevo tipo de vectores que permiten la entrega diferencial de ácidos nucleicos con respecto a otros agentes. Utilizados como vectores de vacunación, pueden ser de especial interés para desarrollar vacunas basadas en antígenos en aquellos casos en los que no se dispone de la secuencia del gen que codifica para los antígenos de interés. Abreviaturas: CH, colesterol; DP, dicetil fosfato ; PC, fosfatidilcolina; PEI, polietilenimina; SM, esfingomielina.

SESIÓN II. COMUNICACIONES PÓSTER

Comunicación Póster 1

EXPRESIÓN HEPÁTICA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES MEDIANTE INYECCIÓN INTRAPORTAL DE VIRUS ADENOASOCIADOS EN EL MO-DELO DE HEPATITIS CRÓNICA DE LA *MARMOTA MONAX*.

P. Berraondo, L. Ochoa, J. Crettaz, R. García, A. Vales, M. Zaratiegui, J. Prieto, G. González, J. Ruiz.

División de Terapia Génica y Hepatología. Universidad de Navarra.

La infección del virus de la hepatitis de la marmota (VHM) en la especie *Marmota monax* se ha empleado para estudiar la patogénesis, prevención y tratamiento de la infección por virus de la hepatitis B humana (VHB). La inmunoterapia de las hepatitis crónicas virales usando proteínas recombinantes como IFNa, IL12 o GM-CSF ha demostrado tener una eficacia limitada y no está exenta de efectos adversos. La terapia génica puede permitir una liberación local y sostenida de proteínas terapéuticas limitando los efectos adversos debidos a la distribución sistémica del fármaco. La marmota constituye un modelo animal de gran tamaño en el que los protocolos de terapia génica para el tratamiento de la hepatitis B crónica pueden ser probados y optimizados. Los virus adenoasociados (AAV) tipo 2 permiten una expresión prolongada de genes terapéuticos en hepatocitos, obteniéndose expresión en hasta un 5% de las células hepáticas. Es por ello un vector apropiado para la terapia génica de las hepatitis crónicas vírales. Se produjeron dos virus adenoasociados recombinantes uno con el gen de luciferasa y otro con el gen del interferón alfa 5 de la marmota. El casete de expresión está formado por el promotor del factor de elongación 1 alfa humano, el transgén, el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota y la señal de poliadenilación del virus SV40. Las producciones se hicieron mediante transfección de células 293 usando como vector no viral polietilenimina y se purificaron los virus mediante cromatografía de afinidad en columnas de heparina. Los virus fueron titulados mediante PCR en tiempo real y su actividad se comprobó tanto *in vitro como in vivo*. La infección de marmotas se llevó a cabo mediante inyección intraportal. El análisis de la expresión de luciferasa demostró que la cinética del ADN viral y de expresión en el hígado es similar a la observada en otras especies, manteniéndose la expresión durante los seis meses que duró el estudio. Así mismo, no se observó ninguna reacción adversa debido a la interacción con el VHM, indicando que la administración de AAV en pacientes con VHB es segura. La inyección de AAVIFNa en marmotas crónicas indujo disminución en los niveles virales de estas marmotas, si bien nunca se alcanzó una eliminación completa. Para aumentar la eficacia de este tratamiento será necesario aumentar la dosis o probar nuevos serotipos que infecten mejor el hígado.

Comunicación Póster 2

IDENTIFICACIÓN DE DIANAS Y RIBOZIMAS TIPO HAIRPIN MÁS EFICIENTES EN LA INACTIVACIÓN DE RNAs A PARTIR DE LIBRERIAS COMBINATORIALES DE RIBOZIMAS.

Alicia Barroso-delJesus, Elena Puerta-Fernández, Cristina Romero-López y Alfredo Berzal-Herranz

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", CSIC. Granada

Los RNAs *antisense* en general y en particular las ribozimas son buenos candidatos para el desarrollo de herramientas encaminadas a la inactivación génica. El potencial de estas moléculas reside en su gran especificidad, que está determinada por interacciones RNA-RNA, por complementariedad de secuencia, entre la ribozima y el sustrato. Aunque se ha demostrado extensamente la capacidad supresora de estas moléculas que ha llevado incluso al desarrollo de varios ensayos actualmente en fase clínica, hasta la fecha no existen estrategias generales que permitan el diseño eficiente de estas moléculas. Hasta la fecha el diseño de las mismas se basa en ensayos de prueba y error. Nosotros hemos desarrollado un método experimental que permite la identificación directa y simultánea de dianas útiles dentro de un RNA largo, así como de las ribozimas tipo hairpin responsables del procesamiento del RNA en ese sitio concreto. El método que describimos se basa en el empleo de librerías combinatoriales de RNA, moléculas potencialmente autocortables, de manera que la librería incluye todas las posibles especificidades de la ribozima tipo hairpin. Esta estrategia se ha desarrollado utilizando como RNA modelo el RNA mensajero del gen *lacZ* de *E.coli*. Después de cinco ciclos consecutivos de selección se han identificado dos variantes de la ribozima que procesan de manera específica el RNA, los cuales muestran una inhibición significativa tanto en células de *E.coli* como en células eucariotas.

Comunicación Póster 3

VACUNACIÓN TERAPÉUTICA DE LA HEPATITIS CRÓNICA UTILIZANDO CÉLULAS DENDRÍTICAS INGENIERIZADAS

L. Ochoa, P. Berraondo, J. Crettaz, A. Vales, J. Prieto, J. Ruiz, G. González-Aseguinolaza

División de Terapia Génica y Hepatología. Universidad de Navarra.

INTRODUCCIÓN: La cronificación de la hepatitis B parece estar relacionada con una respuesta inmune subóptima. Sólo aquellos pacientes capaces de desarrollar una respuesta inmune multiespecífica y policlonal superan la infección viral. Estudios muy recientes demuestran que la respuesta inmune celular frente al antígeno del core, de forma particular, juega un papel fundamental en la resolución de la enfermedad. La interleuquina 12 (IL-12) es una citoquina pleiotrópica, fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune frente a un antígeno estimulando la producción de IFNy, modulando así la respuesta inmune celular hacia tipo Th₁ y potenciando la respuesta citotóxica. Las células dendríticas (DC) son la única población de células profesionales presentadoras de antígeno capaces de iniciar la respuesta inmunitaria estimulando linfocitos T sin experiencia antigénica previa.

OBJETIVO: Inducción preferente de una respuesta helper tipo TH₁ y CD8 frente al antígeno del core, mediante la administración de DC transfectadas con antígeno del core e IL-12, en un modelo de ratón, como un paso previo a otros modelos animales de hepatitis crónica (marmota).

MATERIAL Y MÉTODOS: Para poner a punto el sistema y caracterizar la respuesta inmune generada tras la administración de DC ingenierizadas, empleamos ratones Balb/c de 4-6 semanas de edad. Los ratones fueron inmunizados subcutáneamente con 5*10⁵ DC transfectadas con adenovirus recombinantes de primera generación (MOI de 200) que expresan la proteína del core del virus de la marmota (DC+AdWHC) con y sin IL-12 murina (DC+AdWHC+mAdIL12). Dos semanas más tarde se les extrajo sangre, a los ratones inmunizados tras lo cual fueron sacrificados y se les extrajo el bazo. La respuesta inmune celular se analizó mediante ensayo de ELISPOT utilizando los esplenocitos incubados durante 48 horas con proteína del core recombinante. La respuesta humoral frente al antígeno de los animales inmunizados fue analizada directamente por ELISA.

RESULTADOS: Tanto los esplenocitos de animales inmunizados con DC+AdWHC+mAdIL12 como con DC+AdWHC producen IL-4 tras estimulación con core. Sin embargo, la proteína del core induce la producción de IFNy sólo en aquellos linfocitos obtenidos de ratones inmunizados con DC+AdWHC+mAdIL12. Solamente se detectaron anticuerpos específicos frente al core en aquellos animales inmunizados con DC+AdWHC+mAdIL12. Según estos resultados parece que es necesaria la IL-12 para potenciar la respuesta inmune generada por el antígeno del core.

Comunicación Póster 4

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE LA PROPIEDADES ANTIVIRALES DE ACIDOS NUCLEICOS PEPTÍDICOS (PNA).

Puri Fortes¹, Pedro Berraondo¹, Beatriz García de la Torre²,Nerea Razquin¹, Africa Vales¹, Yolanda Cuevas¹, Gloria Aseguinolaza¹, Juan Ruiz¹ y Ramón Eritja²

¹Departamento de medicina Interna y Unidad de Hepatología. Universidad de Navarra. Pamplona.

²Instituto de Biología Molecular de Barcelona, C.S.I.C., Barcelona.

La capacidad de los oligonucleótidos sintéticos de unirse a secuencias complementarias se ha utilizado enormemente en el aislamiento, amplificación y detección de genes. En la década de los ochenta se demostró que esta capacidad podía servir para la inhibición selectiva de genes tanto *in vitro* como *in vivo*. Desde entonces hasta el momento presente se han desarrollado derivados de los oligonucleótidos sintéticos con el fin de mejorar su capacidad inhibitoria, entre los que destacan los ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Los PNA son análogos de oligonucleótidos en los que el esqueleto de ribosa-fosfato se ha reemplazado por un esqueleto pseudopeptídico formado por unidades N-(2-aminoetil)glicina, a las que se han unido las nucleobases. Los oligómeros de PNA se unen con gran afinidad y selectividad a cadenas complementarias de ADN y ARN y además presentan una gran estabilidad tanto química como biológica frente a nucleasas. Estas propiedades los hacen interesantes para la inhibición de la expresión génica. En la presente comunicación se describe la preparación y la evaluación de las propiedades inhibitoras de PNAs que hibridan contra la región del IRES del virus de la Hepatitis C. Los PNAs ensayados contienen diversos amino ácidos en los extremos N- y C- terminales. Se presentarán los resultados de la actividad inhibitoria de estos oligómeros en un sistema de extractos *in vitro*. Finalmente, se describirán las diversas estrategias que se han estudiado para la traducción del IRES del virus de la Hepatitis C en células en cultivo.

Comunicación Póster 5

DEVELOPMENT OF A MODIFIED U1 SNRNA LIBRARY FOR KNOCKDOWN GENE FUNCTION STUDIES

Mikel Zaratiegui, Jesus Prieto, Puri Fortes.

University of Navarra. Department of Medicine. Pamplona. Spain.

Modified U1 snRNAs can specifically inhibit gene expression by interfering with pre-mRNA processing. These U1 snRNA display a recognition sequence that binds to the 3’ UTR of the target gene blocking the polyadenylation of the pre-mRNA. The recognition sequence can span between 8 and 16 base pairs, even if 10-11 hybrids yield the best inhibition..

This short sequence requirement makes it feasible to design a library of modified U1 molecules that would cover all the genome sequence using conventional molecular biology techniques. A similar approach using RNAi would be impracticable. This library can be cloned through random oligo-nucleotides in the context of an integrative retrovirus. Such a library of modified U1-containing retroviruses would enable us to infect cells in culture, expose them to a lethal treatment and screen for a survival phenotype. The modified U1 from the surviving clones would be recovered and its target binding site sequenced. We believe that this strategy will allow us to identify the gene that is being knocked down to confer the survival phenotype. We are currently adapting viral vectors for its use with the modified U1 system. The general strategy will be presented and preliminary data will be discussed.

36 | II REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE TERAPIA GÉNICA

SESIÓN III. COMUNICACIONES PÓSTER

Comunicación Póster 1

TRASPLANTE IN UTERO DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS COMO UNA ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS.

P. Río¹, J. Martínez-Palacio², A. Ramírez², J.A. Bueren¹, J.C. Segovia¹

Proyecto de Terapia Génica de la Hematopoyesis¹

Proyecto de Epitelios². CIEMAT/Fundación. M. Botín. Madrid.

El trasplante *in utero* de células hematopoyéticas (TIU) es una alternativa al trasplante postnatal en aquellas enfermedades hereditarias que pueden ser tratadas mediante trasplante de progenitores hematopoyéticos y que pueden ser diagnosticadas en estadio prenatal. Con la intención de evaluar la utilidad de esta aproximación, células hematopoyéticas totales procedentes de ratones singénicos o alogénicos y progenitores enriquecidos Lin^{Sca-1+} fueron trasplantados en fetos de 14,5 días de gestación y el porcentaje de quimerismo fue analizado un mes después del nacimiento. El trasplante de células de médula ósea sin purificar rindió injertos hematopoyéticos exógenos del 1-2%, con porcentajes relativamente superiores cuando el trasplante se realizó con células singénicas al receptor. El trasplante de progenitores enriquecidos, sin embargo, rindió injertos más elevados (hasta un 35%), siendo los más altos reportados en la literatura hasta el momento. Para analizar la capacidad de injerto *in utero* de células manipuladas ex vivo y transducidas con vectores retrovirales, células Lin^{Sca-1+} se purificaron y estimularon *in vitro* durante 48 horas en presencia de interleukina-11 y *stem cell factor* y se transdujeron con un vector retroviral expresando la proteína verde fluorescente. Los progenitores así transducidos se trasplantaron *in utero*. El análisis de los receptores trasplantados demostró la existencia de injerto estable de las células exógenas y expresión del transgén hasta 6 meses post-trasplante en receptores primarios, así como en receptores secundarios, demostrando que células con capacidad de reconstitución tanto a corto como a largo plazo se habían transducido y habían injertado en el receptor trasplantado *in utero*.

En conclusión, el trasplante *in utero* de células normales y/o transducidas con vectores retrovirales es una estrategia de potencial aplicación para el tratamiento enfermedades hereditarias, ya que permitiría la corrección de la enfermedad antes de que esta se manifestase. Además, el éxito de injerto en ausencia de acondicionamiento del receptor facilitaría el tratamiento de enfermedades que confieran hipersensibilidad celular a radio/quimioterapia.

Comunicación Póster 2

TRANSGENE EXPRESSING BONE MARROW CELLS DO NOT ELICIT IMMUNE RESPONSES AFTER TRANSPLANTATION INTO NON MYELOABLATED MICE

Pérez-Melgosa M, Eixarch H, Bote A, Barquinero J.

Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular. Centre de Transfusió i Banc de Teixits. Barcelona.

Objective: A major goal in gene and cell therapies for inherited diseases using stem cells is to reduce the amount of myeloablation and immunosuppression (conditioning) necessary to achieve clinically relevant levels of engraftment. The goal of this study is to determine whether the infusion of hematopoietic cells expressing potentially immunogenic transgenes can induce immune responses in non conditioned (normal) recipients. Methods: BM cells from transgenic mice carrying the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene under the ,-actin promoter (C57Bl6/J EGFP+) (a gift from Dr. J. Bueren and J. Martínez, CIEMAT, Madrid) were transplanted at two cell doses (2x10⁶ and 2x10⁷) in the tail vein of non conditioned recipients (C57Bl6/J) (groups of 5 animals). Engraftment was assessed by flow cytometry in the peripheral blood (PB) 21 days later and, at day 40th the animals were euthanized to analyze engraftment in the PB and the BM, and the presence of immune responses to EGFP, by sensitive ELISA (serum antibodies) and ELISPOT (Á-IFN in spleen cells) assays. Results: Low levels of engraftment (≈ 0.1%) were detected in the PB of most recipient mice 21 days after transplantation, regardless the cell dose administered. No EGFP⁺ cells were observed in the PB or the BM 40 days after the cell infusion. Analysis of immune reactivity in the recipient mice by ELISA were negative in all groups of recipient mice (controls and those transplanted with EGFP⁺ cells). We are now analyzing cellular immune responses by a sensitive ELISPOT assay.

Conclusion: Transplantation of gene modified murine cells (expressing EGFP) into normal syngeneic recipients (C57Bl6/J) does not elicit humoral immune responses to the transgene product. This has important implications in gene therapy protocols for inherited diseases using gene modified hematopoietic stem cells.

Barcelona, 28-29 DE MARZO DE 2003 | 37

Comunicación Póster 3

DISTINTOS PATRONES DE EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN EN CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS HUMANAS TRANSDUCIDAS CON VECTORES ONCORETROVIRALES Y LENTIVIRALES

G. Guenechea¹, J.C. Segovia¹, M. Ramírez¹, O. Gan³, C. Dorrell³, A. Limón², J. Barquinero², J. E. Dick³ and J. A. Bueren¹

¹Proyecto de Terapia Génica de la Hematopoyesis. CIEMAT/Fundación Marcelino Botín, Madrid

²Unitat de Recerca, Centre de Transfusio i Banc de Teixits, Barcelona

³Hospital for Sick Children, Toronto, Canadá

La eficacia de transducción de vectores oncoretrovirales y lentivirales en células hematopoyéticas humanas con capacidad de reconstitución se ha estudiado con detalle gracias al modelo de trasplante xenogénico de células hematopoyéticas humanas en ratones inmunodeficientes. Sin embargo, muy pocos estudios han analizado el comportamiento de la expresión de los transgenes transferidos por ambos sistemas de vectores. Con el objetivo de investigar las diferencias en el patrón de expresión cuando se utilizan estos dos vectores retrovirales, hemos determinado la intensidad media de fluorescencia (MFI) después de la transducción de células CD34⁺ de sangre de cordón con vectores lenti- y oncoretrovirales que codifican la proteína EGFP. Cuando las muestras transducidas con vectores oncoretrovirales (SF-EGFP1, promotor quimérico FEMV) se mantienen durante 3 semanas en cultivos líquidos, la MFI de la expresión de EGFP alcanzó niveles óptimos a los 3 días después del último ciclo de infección. En este modelo de diferenciación *in vitro*, los valores de MFI son siempre más altos en células mieloides en comparación con células eritroides, megacariocíticas o progenitoras. Cuando las muestras se trasplantaron en ratones NOD/SCID y se analizaron periódicamente los valores de MFI en la población CD45⁺, se observó un descenso en los valores de MFI en las muestras obtenidas a los 40 y 90 días post-trasplante en comparación con las muestras de 20 días. Este resultado se correspondía con una reducción generalizada en la proporción de CD45⁺EGFP⁺ a esos mismos tiempos. En este modelo *in vivo*, los valores de MFI fueron significativamente más altos en células mieloides (CD33) que en células B (CD19). Además, también se compararon dos construcciones de vectores lentivirales que expresaban EGFP bajo el control del promotor CMV o PGK. Aunque se observó un descenso marcado de MFI en las células CD45 en comparación con las muestras no trasplantadas (analizadas una semana después de la infección), los valores de MFI no variaron entre 20 y 90 días post-trasplante. Este resultado se correlacionaba con el mantenimiento o incluso aumento de los porcentajes de células CD45⁺EGFP⁺ detectados a distintos tiempos post-trasplante. Cuando se determinaron los valores de MFI en células mieloides y linfoides *in vivo*, se observaron valores similares de EGFP MFI en las poblaciones injertadas (CD33, CD19 y CD34), independientemente del promotor utilizado. Los resultados obtenidos indican que bajo nuestras condiciones experimentales, los cambios en el nivel de expresión de los transgenes integrados, tanto de linaje como los relacionados con el momento del análisis, son menos evidentes cuando se utilizan vectores lentivirales en comparación con los oncoretrovirales.

Comunicación Póster 4

TRANSDUCCIÓN RETROVIRAL A CÉLULAS STEM HEMATOPOYÉTICAS MURINAS. MODELO PRECLÍNICO DE TERAPIA GÉNICA DEL SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH.
Miguel Aracil, Piedad Fernández y Antonio Bernad.
Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, Universidad Autónoma, Madrid.
El síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) es una inmunodeficiencia ligada al cromosoma X, cuyo cuadro típico consiste en trombocitopenia, eczema e infecciones recurrentes; en muchos casos se ha descrito autoinmunidad y transformación neoplásica. El tratamiento más adecuado es el trasplante de médula ósea con HLA idéntico, mostrando una supervivencia a largo plazo muy buena. El desarrollo de un protocolo de terapia génica puede ser la solución para los pacientes que carecen de un donante adecuado. La proteína responsable del síndrome (WASp) está implicada en la reorganización del citoesqueleto de actina en respuesta a señales extracelulares. El modelo murino del ratón knock-out en la proteína WASp tiene un fenotipo menos acusado que el síndrome humano, si bien los ratones KO también presentan trombocitopenia y una alteración en la funcionalidad de células B y T y en las respuestas quimiotácticas. Hemos transducido células de médula de ratones KO WASp con vectores retrovirales (pLZR y pRRV) y lentivirales con el gen WAS, utilizando NGFR como marcador de selección; la eficacia de transducción fue del 50-60% con los vectores retrovirales y del 5-15% con los vectores lentivirales. A los 3-4 días post-infección las células NGFR ⁺ se purificaron y se trasplantaron a ratones wild-type o KO irradiados letalmente. Al cabo de 1-3 meses después del trasplante se analizaron los parámetros hematológicos y la expresión de marcadores en órganos hematopoyéticos, verificando si las células de médula KO transducidas con el gen WAS eran capaces de rescatar las alteraciones fenotípicas observadas en los ratones KO. La expresión del marcador NGFR en las células de médula del los animales receptores, 1-3 meses después del trasplante, es generalmente baja (<10%), aunque en algún caso se han llegado a observar niveles de expresión más altos (20-30%). En alguno de los animales trasplantados con células KO transducidas con el gen WAS se ha observado una cierta normalización de las alteraciones fenotípicas debidas a la médula KO; la falta de respuesta en otros animales puede ser debida a un silenciamiento del promotor retroviral o a una reconstitución endógena elevada.

Comunicación Póster 5

VARIACIONES FUNCIONALES Y FENOTÍPICAS EN LINFOCITOS T HUMANOS SOMETIDOS A TRANSDUCCIÓN CON VECTORES RETROVIRALES.
M. Lamana*, A. Balas#, J.L. Vicario# y J.A. Bueren*.
Proyecto de Terapia Génica de la Hematopoyesis. CIEMAT/Fundación Marcelino Botín* Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid#. Madrid.
La transducción de linfocitos T alogénicos con vectores retrovirales que codifican genes suicidas es una alternativa para el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped (EICH) severa. En estudios previos demostramos que tanto la eficacia de transducción por vectores retrovirales que codifican los genes HSV-tk y DNGFR, como el número total de linfocitos transducidos eran mayores si éstos se activaban con los anticuerpos monoclonales anti-CD3i/28i. Ahora investigamos el impacto que la activación, la transducción y la selección de las células transducidas tienen sobre el funcionalismo de estas células. En primer lugar analizamos las respuestas proliferativa y citotóxica de las células frescas y transducidas frente a una estimulación alogénica. En los primeros experimentos las células fueron activadas con 1mg/ml de anti-CD3i y CD28i, observándose que la capacidad citotóxica fue menor en las células transducidas respecto a las células frescas. Las respuestas fueron similares en las fracciones NGFR ⁺ y NGFR ⁻ de linfocitos transducidos y seleccionados con métodos inmunomagnéticos. Sin embargo, la estimulación con 1mg/ml de anti-CD3i y CD28i cambió el fenotipo naive de las células CD8 ⁺ (CD45RA ⁺ /CCR7 ⁺ , 70% en células frescas), a un fenotipo mayormente efector de memoria CD45RA ⁻ /CCR7 ⁻ (60-90% en muestras transducidas). Al reducir la concentración de anti-CD3i mil veces -1ng/ml-, las eficacias de transducción fueron similares, pero alrededor del 20% de las células se mantuvo naive CD45RA ⁺ /CCR7 ⁺ . En los siguientes experimentos, analizamos el fenotipo de las células seleccionadas por la expresión del transgén ΔNGFR. En estos experimentos encontramos que la población naive observada en las muestras activadas con 1 ng/ml anti-CD3i estaba sólo en la población NGFR-. Al investigar la citotoxicidad de los linfocitos activados a baja concentración de anti-CD3i, tanto las células NGFR ⁺ como NFRG ⁻ mostraron un aumento significativo en la capacidad citolítica comparada con las células activadas a altas concentraciones, si bien nunca alcanzó el observado en células T frescas. Nuestros resultados sugieren que la reducción de la concentración de anti-CD3 no afecta a la susceptibilidad de las células T a la transducción retroviral y mejora su capacidad citolítica contra células alogénicas. Además, observamos diferencias significativas en el fenotipo CD45RA/CCR7 en las poblaciones NGFR ⁺ y NFRG ⁻ que no se reflejaron a nivel funcional.

CHARACTERIZATION OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE ABCG2 TRANSPORTER FOR THE DEVELOPMENT OF NEW EXPRESSION VECTORS WITH <i>IN VIVO</i> SELECTABLE POTENTIAL
García-Escarp M ² , Martínez-M V ¹ , Barquinero J ² , Marín J ¹ , Pétriz J ¹
¹ Laboratory of Cryobiology IDIBAPS, Hospital Clinic University of Barcelona
² Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular, Centre de Transfusió i Banc de Teixits, Barcelona, Spain.
Objective: The expression of the ABCG2 gene is an important determinant of the SP phenotype, which relies on the differential ability of stem cells to efflux the Hoechst dye. Since ABCG2 mutations at arginine 482 show a differential drug efflux capacity, we have used different fluorescent substrates to monitor the ABCG2 function of both the wt and two mutant forms of the transporter in human cells.
Methods: KB3.1 cells were transfected with the full-length cDNA encoding wt human ABCG2 (R482), and with the mutant forms (R482T and R482G). The cells were continuously maintained under the presence of 13 nM mitoxantrone (for R482), and 10 µg/ml doxorubicine (for both mutants) as selective agents. ABCG2 expression was studied by flow cytometry using a monoclonal antibody recognizing an external domain (MAB4155, Chemicon). Different fluorescent dyes were assayed using both efflux and retention functional experiments. Cells (105 cells/ml) were loaded with different probes for 1 h at 37°C. Dye efflux was monitored for up to 3 hours. Both efflux and retention experiments were conducted using 5 µM fumitremorgin (FTC), a specific ABCG2 inhibitor.
Results: R482 cells were able to efflux 800 nM mitoxantrone (MTX). Mutant cells (both R482T and R482G) were able to efflux the following substrates: SYTO-13, Rhodamine 123, doxorubicine, daunorubicine, LDS-751, JC-1 and MTX at a concentration of 50 nM, 100 ng/ml, 5 µg/ml, 2.5 µg/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml and 800 nM respectively. The efflux of Hoechst 33342 was demonstrated using fluorescence microscopy and flow cytometry by means of competitive assays with Rho123 (or SYTO-13). Idarubicine, calcein-AM, DRAQ5 and DiOC6 were not effluxed by mutants. Dye-retention studies demonstrated the inhibitory effect of PSC833, FTC, cyclosporin A and verapamil into R482 cells, whereas verapamil did not have any effect in cells expressing mutant ABCG2.
Conclusion: A variety of fluorescent dyes can be used to monitor the functional activity of the different ABCG2 forms. Therefore, constructs carrying ABCG2 mutants may also help distinguishing the wild type ABCG2 activity in human hematopoietic cells. Vectors carrying mutant versions of the ABCG2 gene can be used for <i>in vivo</i> or <i>ex vivo</i> selection and may enhance expression of therapeutic transgenes in human gene therapy protocols.

Comunicación Póster 7

EVALUACIÓN DEL USO POTENCIAL DE CÉLULAS MESENQUIMALES OBTENIDAS DE GRASA EN TERAPIAS ANTITUMORALES

Daniel Rubio, Javier García Castro, Ricardo de la Fuente, Antonio Bernad

Departamento de Inmunología y Oncología. Centro Nacional de Biotecnología (Madrid).

Las células madre mesenquimales han sido protagonistas en los últimos meses de multitud de comunicaciones científicas, generando con ello grandes expectativas de potenciales aplicaciones biomédicas. Inicialmente este tipo de células se obtuvo de la médula ósea aunque cada vez son más las publicaciones en que se describe la obtención de células pluripotentes a partir de otros tejidos. Sin embargo muchos de estos tejidos difícilmente serán accesibles para su utilización clínica, por lo que la obtención de este tipo de células a partir de tejido adiposo facilitaría enormemente sus aplicaciones dada la facilidad de acceso a este tejido y el gran número de células que de él se pueden obtener.

Una de las potenciales aplicaciones podría ser su utilización en terapias antitumorales. Esta aproximación estaría basada en el hecho de que diversos autores han visto como células mesenquimales son capaces de responder a señales de los tumores, localizarse en los mismos e incluso formar nuevos vasos. Manipulando *ex vivo*, con protocolos de terapia génica, dichas células podrían usarse como vehículos celulares que transporten genes terapéuticos al mismo interior de los tumores o sus metástasis.

Nuestro grupo está interesado en la evaluación del potencial del tejido graso como fuente de células mesenquimales capaces de anidar en los tumores y susceptibles de ser tranducidas con vectores virales. Dichos vectores podrían transcribir genes terapéuticos tales como genes suicidas, anticuerpos antitumorales, etc. Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio parecen indicar que esta hipótesis puede llegar a ser factible.

SESIÓN IV. COMUNICACIONES PÓSTER

Comunicación Póster 1

PARTICULARIDADES EN EL REPARTO DE LOS GRUPOS DE COMPLEMENTACIÓN EN LOS PACIENTES ESPAÑOLES CON ANEMIA DE FANCONI

José A. Casado,* Paula Rio*, José C. Segovia, * Jordi Surrallés,‡ Elsa Callen‡, Stephan Lobitz,§ Helmut Hanenberg§ y Juan A. Bueren*.

*Proyecto de Terapia Génica de la Hematopoyesis CIEMAT/Fundación Marcelino Botín, Madrid

‡Departamento de Genética U.A.B., Barcelona

§Children's Hospital/Heinrich Heine University, Dusseldorph, Alemania.

La Anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por diversas anomalías físicas, predisposición a cáncer (principalmente leucemia mieloide aguda) y, como principal causa de muerte en los pacientes, fallo de médula ósea a edad temprana. Las características de la AF la hacen candidata para un posible tratamiento mediante terapia génica a nivel de las células madre hematopoyéticas. Existen al menos 8 grupos de complementación (A, B, C, D1/BRCA2, D2, E, F y G) de los cuales 6 genes ya han sido clonados. Se ha estimado que a nivel mundial, el porcentaje de pacientes con mutaciones en *FANCA* es del 65%, del 13% en el gen *FANCC* y del 12% en *FANCG*, estimándose que el 10% restante se debería a mutaciones en cualquiera de los otros 5 genes, aunque esta distribución puede variar significativamente dependiendo del grupo étnico y la región geográfica. La determinación del grupo de complementación en AF es un paso muy importante previo a la posible consideración de terapia génica en un paciente, además de facilitar enormemente el estudio mutacional lo que posibilita la detección de portadores en una familia afectada y la correlación entre el fenotipo clínico y su defecto genético. El subtipaje genético de los pacientes de FA se ha realizado en la mayoría de los pacientes mediante transducción retroviral de linfocitos T con genes de Fanconi y reversión de sensibilidad a mitomicina C, estudio que se enmarca dentro de las actividades del recientemente creado Grupo Español para el estudio y tratamiento de la Anemia de Fanconi. En este trabajo presentamos los resultados de 49 pacientes, lo que puede representar aproximadamente el 60% del total de los pacientes españoles con AF. Nueve pacientes mostraron resistencia de los linfocitos T a MMC, por lo que no pudo realizarse el subtipaje en estas células. En tres de estos pacientes se obtuvieron resultados citogenéticos sugerentes de mosaïcismo en las células T. En estos casos la complementación retroviral se realizo en fibroblastos de piel del paciente, pudiendo así determinar el grupo de complementación. De los 43 pacientes subtipados el 79% pertenecieron al grupo FA-A, 4,6% al grupo FA-G y un 16,2% se repartieron en grupos pocos frecuentes como el FA-D2, FA-D1/BRCA2 o grupos aún no conocidos. Es destacable la ausencia de pacientes en el grupo FA-C frecuentemente detectados en pacientes de otros países.

Comunicación Póster 2

CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO TRANSGÉNICO DE DIABETES AUTOIMMUNE. PAPEL DE LA EXPRESIÓN PANCREÁTICA DE IGF-I EN LA PREVENCIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA.

A. Salavert, A. Casellas, E. Ayuso, M. Moya, M.Garcia, S. Franckhauser, S. Muñoz, J. Agudo y F. Bosch

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria y Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG). Universidad Autónoma de Barcelona

La diabetes tipo 1 es el resultado de la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas. En islotes de pacientes diabéticos tipo 1 se ha detectado la presencia de interferón β (IFNβ). Ratones transgénicos que expresan IFNβ humano en las células β obtenidos en nuestro laboratorio presentan alterada la secreción de insulina y son más susceptibles a desarrollar diabetes. Estos ratones presentan una buena viabilidad y se reproducen con facilidad. Tras la administración de dosis muy bajas de STZ (15-20 mg/Kg peso), que no afectan a los ratones control, los ratones transgénicos presentan un incremento crónico de la glucémia y una gran infiltración linfocitaria en sus islotes, con presencia de linfocitos T CD4+ y CD8+. Esto lleva a la destrucción de las células β por un proceso apoptótico. Los resultados indican que los ratones transgénicos que expresan IFNβ en células β podrían ser un buen modelo para desarrollar protocolos de terapia génica o de terapias convencionales para la diabetes tipo 1. El factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) estimula la proliferación y la diferenciación de las células β y es un potente factor antiapoptótico. Ratones transgénicos que expresan IGF-I específicament en las células β del páncreas (RIP/IGF-I), obtenidos en nuestro laboratorio, presentan una recuperación en la masa de células β después de la inducción de diabetes experimental mediante tratamiento con STZ. Con el objetivo de determinar el papel de IGF-I en la contrarrestación de la diabetes autoimmune hemos generado animales dobles transgénicos IFNβ/IGF-I. Los resultados indican que la producción local de IGF-I protege a las células β de la destrucción mediada por el sistema inmune y contrarresta la diabetes experimental inducida por STZ, normalizandose la glucemia, insulinemia y la masa de células β. Por tanto, la transferencia del gen IGF-I a páncreas podría ser una buena terapia para la diabetes tipo 1.

Proyecto financiado por CICYT SAF99-0094 y Fundación La Maratón de TV3.

Comunicación Póster 3

RATONES TRANSGÉNICOS QUE SOBREENPRESAN IGF-I EN EL OJO COMO MODELO DE ENFERMEDAD OCULAR DIABÉTICA.

Eduard Ayuso^{1,3}, Jesús Ruberte^{2,3}, Marc Navarro^{2,3}, Ana Carretero^{2,3}, Mónica George^{1,3}, Victor Nacher^{2,3}, Cristina Costa^{1,3}, Alba Casellas^{1,3}, Virginia Haurígot^{1,3}, Assumpció Bosch^{1,3} & Fátima Bosch^{1,3}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,

²Departamento de Sanidad y Anatomía Animales

³Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica. Universitat Autònoma de Barcelona

La enfermedad ocular diabética se desarrolla en pacientes diabéticos como una complicación secundaria a la desregulación de la glucemia. Incluye retinopatía y menos frecuentemente rubeosis iridis, glaucoma, catarata y parálisis de los músculos extra oculares, representando la causa principal de ceguera en el mundo. El factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I) está incrementado en el cuerpo vítreo de pacientes diabéticos. En nuestro laboratorio obsevamos que ratones transgénicos normoglucémicos que sobrepresaban IGF-I bajo el control del promotor de insulina de rata-I (RIP-I) desarrollaban alteraciones oculares. Estos animales expresaban el transgén en ojos, especialmente en retina. Esta expresión producía un aumento (alrededor de cinco veces más) en la concentración de IGF-I en humor acuoso. Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles séricos de IGF-I entre ratones controles y transgénicos. Los ojos de los ratones transgénicos desarrollaban todas las alteraciones patológicas detectadas en la enfermedad ocular diabética humana, como oclusión vascular, dilatación venosa, grandes áreas sin perfusión y anomalías microvasculares intraretinales (IRMA). Además, tanto en la retina como en el cuerpo vítreo se detectaba neovascularización, la principal característica de la etapa proliferativa. Las alteraciones vasculares se correlacionaban con un incremento de VEGF en los ratones transgénicos. El ángulo irido-corneal contenía acúmulos de células que ocluían la red trabecular, causando de este modo glaucoma. Otra alteración que presentaban era la aparición de cataratas. Por todas estas características, estos ratones transgénicos constituyen un buen modelo animal para la enfermedad ocular diabética, y servirán para el ensayo de nuevas aproximaciones de terapia génica para esta enfermedad. Este estudio está financiado por la EFSD, JDF y NovoNordisk.

Comunicación Póster 4

ADVERSE EFFECTS OF POST-THYMIC GENE TRANSFER REVEALED BY CORRECTION OF HUMAN CD3g-DEFICIENT MATURE T LYMPHOCYTES

Martín-Fernández JM.* , Pacheco-Castro A.*&, Millán R* , Sanal O** , Villasevil EM* , Regueiro JR* .

*Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain. & Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Alfonso X El Sabio. Madrid, Spain
**Hacettepe University Children’s Hospital, 06100 Ankara, Turkey

Figura 1.

The CD3 subunits of the T-cell receptor/CD3 complex (TCR/CD3) help to regulate surface TCR/CD3 expression, and participate in signal transduction leading to intrathymic selection and peripheral antigen recognition by T lymphocytes. Humans who lack individual CD3 chains show impairments in the expression and activation-induced downregulation of TCR/CD3, and the defective immune responses that result may be lethal. We have investigated delivery of a normal CD3 chain to treat disorders of this type. Retroviral transduction of CD3y into CD3y-deficient peripheral blood T lymphocytes from two unrelated patients selectively corrected the observed TCR/CD3 expression and downregulation defects, but unexpectedly also disrupted IL-2 (but not IFN-γ) synthesis, which became constitutive. In addition, the reconstituted T cells specifically caused cell death of untransduced autologous T lymphocytes, most likely by an autoreactive recognition mechanism. These data suggest that gene transfer into post-thymic lymphocytes carrying mutations on T-cell recognition or activation pathways may disrupt their intrathymic calibration and become harmful to the host.

SESIÓN V. COMUNICACIONES PÓSTER

Comunicación Póster 1

INHIBITION OF CELL MIGRATION BY SURVIVIN GENE TARGETING.

Silvia Coma¹, Cinzia Lavarino¹, Veronique Noé¹, Jaume Adán², Francesc Mitjans², Carlos J. Ciudad¹ and Jaume Piulats²

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology. School of Pharmacy . University of Barcelona

²LBI, Merck-Farma, PCB, Barcelona

Figura 1.

Survivin is a member of the inhibitor of apoptosis (IAP) gene family that deserves attention as a selective target for cancer therapy because it is expressed during embryonal development but lacks expression in terminally differentiated adult tissues. Interestingly, it becomes reexpressed in transformed cell lines and in a variety of human tumors. Survivin is expressed in the G2-M phase in a cell cycle-regulated manner, and its interaction with the mitotic spindle apparatus is essential for antiapoptotic function. In additon, Survivin is up-regulated by Angiopoietin-1, an endothelium-specific li-gand essential for angiogenesis.

We used two antisense strategies, a 21-mer phosphorothioate antisense oligonucleotide (ASurv) and a siRNA against Survivin RNA, to down-regulate survivin expression and demonstrate its ability to inhibit cell migration in the endothelial cell line ECV304. ASurv, directed against the translation initiation site, achieved its maximum effect at a concentration of 800nM, at which mRNA was down-regulated by 70%. In these conditions ASurv-oligonucleotide caused: i) a strong growth-inhibitory effect, ii) an increase in apoptosis, iii) cell cycle arrest in G2-M, and iv) inhibition of cell migration in ECV304 cells in a dose-dependent manner. Two control antisense oligonucleotides (a non related oligonucleotide and one presenting 4-mismatches) produced no effect. Using siRNA oligonucleotides against Survivin also produced a high cytotoxic effect and inhibition of cell migration. Thus, these results show that survivin is a good target for cancer chemotherapy since its down regulation increases apoptosis in this endothelial cell line and inhibits cell migration, a parameter in angiogenesis. The two strategies used, classical antisense aODN and the siRNA technology were very effective, although the latter could be used at concentrations 100 times lower, thus increasing the sensitivity of the treatment..

Figura 1.

Acknowledgements: This work was supported by grant FBG 301459

Comunicación Póster 2

REPROGRAMMING CANCER STEM CELLS BY GENE THERAPY

A. Rodríguez-García¹, J. Pérez-Losada¹, M. Sánchez-Martín¹, B. Pintado², and I. Sánchez-García¹.

Figura 1.

¹Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC), Centro de Investigación del Cáncer, CSIC/ Universidad de Salamanca, Campus Unamuno, SALAMANCA, (SPAIN).

² Area de Reproducción Animal, Centro de Investigación y Tecnología, Madrid.

Figura 1.

The main problem facing the effective treatment of patients with cancer is to distinguish between cancer stem cells and normal stem cells. The chimaeric molecules created by cancer-associated chromosomal abnormalities (*BCR-ABL*, in our case) are ideal therapeutic targets since they are unique to the disease. A major problem is how to get the specific anti-tumour drug into every cancer stem cell. In this report we describe the use of a novel strategy to introduce specfic anti-tumour reagent into every cancer stem cells, which uses retroviral vectors encoding both specific antisense transcripts to the *BCR-ABLp*¹⁹⁰fusion junction (the specific anti-tumour drug) and a truncated human CD5 cDNA, which allows to select only the infected cells. In order to co-express the antisense molecule with the truncated human *CD5* gene, we have taken advantage of the picornaviral internal ribosome-entry site. Transgenic mice expressing BCR-ABLp¹⁹⁰ or BCR-ABLp²¹⁰ oncogenes under the control of the metallothionein promoter (MT-p190 and MT-p210) were used as models to study the *in vivo* therapeutic efficiency of this strategy. The MT-p190 phenotype is completely reverted by the retrovirally transduced antisense RNA molecules, and three months after transplantation there are no signs of spleen disease. These data edify a novel strategy for cancer treatment incorporating the use of retrovirus which enables dual expression of both a selectable marker and the tumour specific drug.

Comunicación Póster 3

PARAMYXOVIRUS SV5 FUSION (F) GLYCOPROTEIN ENHANCES CYTOTOXICITY OF ENZYME/PRODRUG-BASED THERAPIES.

Gómez-Treviño, A. and Mercadé, E.

Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias. Facultad Farmacia. Universidad de Barcelona. Barcelona, Spain.

BACKGROUND. Viral fusogenic proteins allow virus entry into host cells and mediate fusion between neighboring cells, which leads to cell death. These properties can be exploited in cancer therapy (*Bateman et al.* 2000). We have reported that transduction of the gene encoding the fusogenic glycoprotein F of the paramyxovirus SV5, mediated by a non replicative adenoviral vector, induces fusion and syncytia formation between tumor cells and exerts a direct and bystander killing effect as potent as the conventional ganciclovir/thymidine kinase suicide therapy (Gómez-Treviño *et al.* 2003). Here we analyze the ultrastructure of F-expressing cells and we evaluate the effectiveness of combining F-delivery with suicide gene therapy strategies to increase diffusion of toxic metabolites.

MATERIAL AND METHODS. A431 (vulvar squamous carcinoma) cells were treated with a non-replicative adenovirus for expressing SV5 F protein (Ad-F) and were used for ultrastructure examination and immunogold labeling. The same cell line was treated *in vitro* with a combination of Ad-F and the Ad-HSVtk (Herpes virus thymidine kinase gene)/ganciclovir (GCV) therapy. The permeability of F-expressing cells to the active GCV metabolite was analyzed by infecting A431 cells with both viruses in separate chambers (Transwell®). A431 cells were also treated with the combination Ad-F and Ad-*CYP2B1* (cytochrome *p450-2B1*)/cyclophosphamide therapy. Cell viability by cell counting was determined to evaluate the sensitivity of A431 cells to these treatments.

RESULTS. A431 F-expressing cells showed increased permeability with loss of LDH and a clear perturbation of cytoplasmic membrane bilayer structure with continuous gaps. Only the cytoplasmic membrane was labeled with immunogold particles. Extensive areas with nuclear aggregation were observed corresponding to fused cells. These areas showed increased vacuolization and cytoplasmic blebbing, consistent with autophagic degeneration. Swelling of nuclei in F-transduced cells was observed but cells with typical apoptotic ultrastructure were not seen. Combination of both cytotoxic gene therapies with F fusion protein expression led to a marked decrease in cell viability of A431 cells.

CONCLUSION. The F fusogenic glycoprotein of the paramyxovirus SV5 enhances the cytotoxic effect of enzyme/prodrug-based therapies, since more of the pro-drug-converting enzyme and the toxic metabolites generated will be able to reach a larger number of target cells.

Comunicación Póster 4

TRATAMIENTO DE UN MODELO DE METÁSTASIS PULMONARES UTILIZANDO POLIETILENIMINA CON EL GEN DE LA INTERLEUQUINA-12.

M Rodrigo Garzón, P Berraondo*, Q Chen*, J J Zulueta, J Ruiz*, J Prieto*, G González Aseguinolaza*.

Servicio de Neumología, Departamento de Medicina Interna*, Universidad de Navarra.

Introducción: La polietilenimina (PEI) es un polímero policatiónico capaz de unirse por atracción electrostática con los grupos fosfatos del ADN que tienen carga negativa y formar complejos. Tras la inyección de estos complejos por vía intravenosa en ratones el nivel más alto de expresión del plásmido se localiza en pulmón. La interleuquina-12 (IL12) es una citoquina con actividad antitumoral por su capacidad de activar células NK, favorecer la formación de linfocitos T citotóxicos y por sus efectos antiangiogénicos.

Objetivo: Demostrar la utilidad de los complejos PEI-IL12 en el tratamiento intravenoso de un modelo de metástasis pulmonares de cáncer de colon. Metodología: Se inyectaron de forma intravenosa 1 x 10⁶ células CT26 por la vena de la cola de ratones Balb/c hembras de 8 semanas para generar metástasis pulmonares. La línea CT26 es una línea de cáncer de colon murino singénica para esta cepa de ratones. A las 24 horas se formaron tres grupos según el tratamiento recibido con suero glucosado al 5% (SG5%) con PEI con el gen de la β-galactosidasa (LacZ) y con PEI-IL12. Los tratamientos se hicieron en 400 µl de SG5% y se utilizaron 100 µg de ADN con una relación entre los grupos N de la PEI y los grupos P del ADN de 4. El número de ratones por grupo fue de 10 y se siguieron hasta su muerte para analizar su supervivencia. Se sacó además sangre para medir en suero los niveles de IL12 e interferón-γ (IFN-γ) a las 6 y 12 horas, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 y 13 días tras la inyección de los complejos. Y se analizó la respuesta inmune celular mediante ELISPOT.

Resultados: Todos los animales tratados con suero glucosado murieron mientras que en el grupo tratado con PEI-LacZ murieron el 50% de los animales y en el tratado con PEI-IL12 no murió ninguno. No se detectaron niveles de IL12 ni de IFN-γ en los sueros del grupo tratado con SG5% mientras que los niveles de IFN-γ en los grupos tratados con PEI-LacZ y PEI-IL12 fueron similares y los de IL12 fueron más duraderos en el grupo con PEI-IL12. En el ELISPOT se vio una respuesta similar con PEI-LacZ y PEI-IL12 y muy superior a la del grupo tratado con SG5%.

Conclusiones: El tratamiento con PEI-ADN ejerce un efecto antitumoral en nuestro modelo de metástasis pulmonares. Este efecto es mayor en el grupo PEI-IL12 que en el grupo PEI-LacZ.

Comunicación Póster 5

USING TUMOUR CELLS AGAINST TUMOURS

Javier García-Castro¹, Jesús Martínez-Palacio¹, Rosa Lillo², Félix García-Sánchez², Ramón Alemany³, Luis Madero⁴, Juan A. Bueren¹, Manuel Ramírez⁵

¹Unidad de Hematopoyesis y Terapia Génica. C.I.E.M.A.T. – Fundación Marcelino Botín, Madrid.

²Centro de Transfusión, Madrid.

³Institut Català d’Oncologia, Barcelona.

⁴Oncología Pediátrica. Hospital Universitario Niño Jesús, Madrid.

⁵Unidad de Investigación. Hospital Universitario Niño Jesús, Madrid.

Many patients are diagnosed of having cancer when the disease has already spread and most of the patients who succumb to cancer die because of metastatic disease. Million of tumour cells leave the primary tumour, reach the bloodstream and disseminate through the body. Only a minority will eventually home in and survive, at anatomical sites specific for many types of tumours, and develop the metastasis.

We hypothesized that tumour cells would be a good candidate for targeting metastasis in vivo, due to the fact that they have the capacity to cross-talk with the molecular factors involved in the metastatic process (detachment, invasion, circulation, cell adhesion, motility, extracellular matrix degradation). We investigated whether intravenously injected tumour cells would co-localized on established metastasis. Furthermore, we tested whether this approach could be used as a new cell-based therapy for metastasis.

Comunicación Póster 6

EFFECTS OF HISTONE DEACETYLASE ACTIVITY INHIBITION IN COMBINATION WITH p16^{INK4a} REINTRODUCTION IN HUMAN PANCREATIC TUMOR CELLS.

Sandra Pérez¹, Manel Cascalló² and Adela Mazo¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology. University of Barcelona.

²Translational Research Laboratory. Institut Català d’Oncologia. Barcelona.

HDAC inhibitors induce growth arrest, differentiation and /or apoptotic cell death due mainly to the modulation of the transcription of genes related to cell proliferation. It has been described that trichostatin A (TSA) induce arrests at both G₁ and G₂/M phases, with concomitant increases in p21 levels. However, controversial results indicate that HDAC’s also contribute to the inhibition of the transcriptional activity of E2F1 favouring the formation of the pRB-E2F1 repressor complex and, in this sense, HDAC inhibition could constitute a proliferative signal. Here, we have treated three human pancreatic tumor cells (NP-9, NP-18 and NP-31) with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) alone or in combination with the adenovirus-mediated reintroduction of wt-*p16* gene. TSA treatment elicited an accumulation of cells in G₂ in all cell lines. Otherwise, when cells were incubated with TSA significant increases in apoptosis levels were observed in NP-18 and NP-31 cells, but not in NP-9. The high levels of p21 protein, which has been proposed as an antiapoptotic factor, might be the responsible of the impossibility to induce apoptosis in these cells. When cells were treated with the combination TSA/p16, two different behaviours were observed, those are related to the different ability of p16 to arrest cells in G₁. In NP-18 cells, in which p16 is not able to elicit G₁ arrest, combination treatment induced an accumulation of cells in G₂ phase, similar to those observed after only TSA incubation. In contrast, NP-9 and NP-31 cells treated with combination of TSA/ p16 exhibited a G₁ arrest, similar to the observed in the only p16 treated-cells. The comparison of these effects clearly indicate that HDAC inhibition by TSA is not capable to overcome the G₁ arrest provoked by p16 overexpression and strongly suggest that HDAC activity is not the main factor implied in the maintenance of E2F1 repression by pRB.

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente:

Jordi Barquinero (CTBT)

Secretario:

Dominique Gallardo (CTBT)

Vocales:

Ramon Alemany (Instituto Catalán de Oncología)

Josep Arán (Instituto de Investigación Oncológica, IRO)

Joan Bertrán (Universidad de Barcelona)

Assumpció Bosch (Universidad Autónoma de Barcelona)

Javier Briones (Hospital de Sant Pau)

Miguel Chillón (ICREA, UAB)

Carlos Ciudad (Universidad de Barcelona)

Cristina Fillat (Centro de Regulación Genómica)

Jordi Gómez (Hospital Valle de Hebrón)

Adela Mazo (Universidad de Barcelona)

COMITÉ CIENTÍFICO

Salvador F. Aliño (Universidad de Valencia)

Antonio Bernad (CNB, Madrid)

Alfredo Berzal (CSIC, Granada)

Fàtima Bosch (Universidad Autónoma de Barcelona)

Juan Bueren (CIEMAT, Madrid)

Félix García Sánchez (Centro de Transfusión, Madrid)

Gonzalo Hortelano (Universidad McMaster, Ontario, Canadá)

Adela Mazo (Universidad de Barcelona)

Bruno Sangro (Universidad de Navarra)

SEDE

Casa Convalescència

Sant Antoni Maria Claret, 171

08041 Barcelona

tel. 934 335 002

Espónsors:



Secretaría Técnica:

IRE Viajes
Plaza Gala Placidia 8, 1º 2ª
08006 Barcelona, Spain
Tel. +34 932387455
Fax. +34 932384579
E-mail: at@chi.es