

Revista Colombiana de Cancerología

www.elsevier.es/cancerologia



REVISIÓN

Terapia génica para el tratamiento del cáncer

Josefa A. Rodríguez*, Lina M. Martínez, Nataly Cruz y Alba L. Cómbita

Grupo de Investigación en Biología del Cáncer, Instituto Nacional de Cancerología ESE., Bogotá, D.C., Colombia

Recibido el 17 de septiembre de 2013; aceptado el 10 de febrero de 2014

PALABRAS CLAVE

Compensación de mutaciones;
Quimioterapia molecular o terapia génica suicida;
Terapia antiangiogénesis;
Oncólisis viral;
Inmunopotenciación genética

KEYWORDS

Mutation compensation;
Molecular chemotherapy;
Antiangiogenic gene therapy;
Viral oncolysis;
Genetic immunopotentiation

Resumen El cáncer es una enfermedad compleja de etiología desconocida. Factores genéticos y epigenéticos se asocian al incremento en el riesgo de desarrollar esta enfermedad.

A pesar del avance en los tratamientos tradicionales contra el cáncer, el pronóstico de los pacientes no ha mejorado significativamente. Estudios en la patogénesis molecular del cáncer han evidenciado la existencia de dianas moleculares con potencial terapéutico que permiten trasladar los conocimientos de la investigación básica a la clínica implementando nuevas terapias para el beneficio del paciente.

El conocimiento del genoma viral, su función, replicación y los mecanismos de infección a la célula tumoral han permitido el desarrollo de la terapia génica viral que puede ser la herramienta ideal para el tratamiento del cáncer.

Este artículo revisa diferentes metodologías desarrolladas para el diseño de una terapia génica contra el cáncer, abordada desde diferentes contextos biológicos, y su aplicación clínica para el tratamiento del cáncer.

© 2013 Instituto Nacional de Cancerología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Gene therapy for cancer treatment

Abstract Cancer is a complicated disease of unknown etiology. Genetic and epigenetic factors are associated with an increased risk for developing this disease.

Despite the progress in the traditional cancer therapies, the prognosis of patients has not improved significantly. Studies on the molecular pathogenesis of cancer have demonstrated the existence of molecular targets with therapeutic potential. Furthermore, knowledge of the viral genome function and replication, as well as of the mechanisms of tumor cell infection, have made it possible to develop an ideal tool for gene therapy against cancer and thus, enable the transfer of knowledge from basic to clinical research for the benefit of patients.

This article reviews different methodologies developed to design a cancer gene therapy and its clinical application for treating cancer, addressed from various biological contexts.

© 2013 Instituto Nacional de Cancerología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

*Autor de correspondencia.

Correo electrónico: jrodriguezg@cancer.gov.co (J.A. Rodríguez).

Introducción

El cáncer es un problema de salud pública cuya incidencia y mortalidad se han incrementado durante las últimas décadas. Según estudios realizados por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer, en el año 2015, aproximadamente 7.564.802 personas morirán por esta enfermedad¹. A pesar de los avances quirúrgicos y del desarrollo de nuevos fármacos, el pronóstico de los pacientes con cáncer no ha mejorado significativamente, por lo cual se requiere el desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas como la terapia génica, una aproximación viable y segura para el tratamiento de pacientes con cáncer. Esta terapia se basa en la introducción de genes funcionales en células somáticas para corregir defectos genéticos o ejercer un efecto terapéutico^{2,3}. Se utilizó por primera vez con intención terapéutica en 1990 para el tratamiento de la inmunodeficiencia severa combinada ADA-SCID^{4,5}, y posteriormente, para la inmunodeficiencia severa combinada SCID-X1^{6,7}. Pese a que los resultados no fueron muy alentadores en su momento⁸, se demostró que la terapia génica humana es factible y puede ser útil para el tratamiento de enfermedades genéticas, por lo cual se han desarrollado estrategias para aplicarla en el tratamiento de enfermedades complejas como el cáncer^{9,10}.

Durante la última década, los vectores virales se convirtieron en la herramienta ideal para mejorar el tratamiento del cáncer. Dada la complejidad de esta enfermedad, es indispensable conocer la secuencia de eventos genéticos y epigenéticos implicados en la transformación maligna para aplicar este conocimiento al desarrollo racional de vectores que puedan utilizarse para el tratamiento del cáncer. El sistema viral más eficiente para la transferencia génica contra el cáncer *in vivo* es el basado en adenovirus. Estos virus poseen características biológicas deseables en un vector viral: transfieren y expresan el gen terapéutico en células quiescentes o en división, son de fácil manipulación y propagación *in vitro*, no se integran en el genoma celular y tienen ciclo de vida lítico. Adicionalmente, inducen una fuerte respuesta inmune *in vivo* que potencializa la inmunidad antitumoral y permite la rápida eliminación del vector, lo que garantiza un efecto antitumoral de corta duración que protege las células sanas de la exposición prolongada a productos tóxicos. Los ensayos clínicos dirigidos contra diferentes dianas moleculares utilizando adenovirus han arrojado resultados alentadores¹¹.

El objetivo de este artículo es revisar los conceptos básicos en terapia génica y su aplicación para el tratamiento primario del cáncer o como coadyuvante en los tratamientos tradicionales. Además, se describen diferentes estrategias terapéuticas que están siendo evaluadas para su uso y aplicación clínica.

La búsqueda de bibliografía se realizó con las palabras clave: compensación de mutaciones, quimioterapia molecular o terapia génica suicida, terapia antiangiogénesis, oncólisis viral, e inmunopotenciación genética, en las bases de datos PubMed, MedLine, LILACS, (Literatura Latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud), the Cochrane Library y CANCERLIT.

Sistemas para la introducción de material genético en las células

La transferencia de genes terapéuticos en células eucariotas puede realizarse por métodos físicos o químicos (transferen-

cia no viral), y biológicos (transferencia viral)². La transferencia génica no viral se denomina transfección (infección de una célula con un ácido nucleico libre) y depende de los sistemas de transporte celulares para internalizar el ácido nucleico y expresar el gen terapéutico. Los métodos más empleados para la transfección son: electroporación, bombardeo de partículas y liposomas catiónicos. En contraste, la transferencia génica viral depende de un virus para transferir el material genético en el interior celular, se denomina transducción (el virus conduce el gen terapéutico a través de la membrana al interior celular) o infección, y el gen terapéutico se denomina transgén.

Aunque los sistemas no virales para la transferencia de genes al interior celular tienen muchas ventajas^{12,13}, en ensayos clínicos se emplean más los sistemas virales por su tamaño, su cápside proteica que protege al gen terapéutico de la degradación enzimática, y sus mecanismos de internalización eficientes. Además, el genoma viral se puede manipular para eliminar los genes de patogénesis y diseñar virus con alta capacidad de infección y con espacio suficiente para el transgén terapéutico (tabla 1)¹⁴. Los virus más utilizados en terapia génica incluyen miembros de las familias Retroviridae (gammaretrovirus y lentivirus)^{15,16}, Adenoviridae^{17,18}, y Herpesviridae (HSV)¹⁹, y Parvoviridae (virus adenoasociados)²⁰.

La transferencia génica viral puede realizarse *in vivo* o *ex vivo*. *In vivo* implica la transferencia génica dentro del organismo. Este método es de fácil aplicación clínica, pero la diana no es completamente específica y la eficiencia de transducción es muy baja. *Ex vivo* implica la remoción de las células del huésped, su modificación genética *in vitro*, y su reimplantación dentro del tejido original. Este es el método de elección para los protocolos que utilizan células dendríticas²¹, o células CD34⁺^{22,23} porque garantiza la especificidad de la diana y permite cuantificar la eficiencia de la transducción^{10,24,25}.

Los adenovirus son muy eficientes para la transferencia génica *in vivo*. Se han identificado 51 serotipos que infectan humanos, pero los más utilizados en terapia génica son el Ad5 y el Ad2, cuya internalización en la célula diana ocurre por la unión de alta afinidad entre la fibra Knob y el receptor coxsackie/adenovirus, seguida por la interacción entre la base pentón y las integrinas (fig. 1A).

Terapia génica contra el cáncer

La transformación maligna es un proceso secuencial mediante el cual una célula adquiere nuevas características que le permiten proliferar sin control e invadir localmente y a distancia. Estas características pueden ser dianas para el diseño de terapias que eliminen las células tumorales, mejoren la respuesta inmune o bloqueen la proliferación tumoral. La eliminación de células tumorales puede llevarse a cabo mediante la terapia por compensación de mutaciones (corrección de genes supresores de tumor o inhibición de oncogenes activados); la terapia génica suicida (infección del tumor con un virus de replicación selectiva que codifique una enzima capaz de activar un profármaco en el tumor) y la terapia oncolítica (infección de las células tumorales con un virus lítico). La respuesta inmune del huésped se puede mejorar mediante una terapia inmunopotenciadora (que

Tabla 1 Técnicas de transferencia génica con sus ventajas y desventajas

Sistema	Técnica	Ventajas	Desventajas
No-viral	Inyección directa ADN/Plásmido	Transferencia local, no tóxica. Simple. Más eficiente en músculo cardíaco o esquelético	Solo tejidos accesibles Baja eficiencia de transfección Expresión génica transitoria No específica
	Pistola de genes	Técnicamente simple Transfección de grandes cantidades de ADN	Daño celular al insertar el ADN Baja eficiencia de transfección
	Electroporación Liposomas catiónicos	Transfección local, simple Para cualquier tipo celular No inmunogénico	Requiere uso de electroporador No hace blanco en una célula específica Baja eficiencia de transfección
Viral	Adenoviridae	Transducción de cualquier tipo celular Células quiescentes, o en división, no se integra en el genoma de la célula diana, Eficiente para transfección <i>in vivo</i> , sobreexpresa proteínas humanas, se pueden producir fácilmente y en altos títulos	Muy inmunogénico Expresión transitoria Potencial desarrollo de virus silvestre Pequeño tamaño de inserción (8Kb de ADN)
	Parvoviridae: virus adenoasociados	Transducción de células en división o quiescentes Integración sitio-específica (Cr 19) Expresión génica de larga duración	Difícil de obtener en altos títulos Riesgo de mutagénesis insercional Pequeño tamaño de inserción (4,7 Kb) Posible inmunogenicidad
	Gamma Retroviridae 5 elementos genéticos	Transducción de cualquier tipo celular en división Integración en el genoma Expresión permanente del transgén Son los vectores más adecuados para la transferencia génica <i>ex vivo</i>	Transduce únicamente células en división Ineficiente <i>in vivo</i> Riesgo de mutagénesis insercional Pequeño tamaño de inserción (8 kb)
	Virus <i>Herpes Simplex</i>	Neotropismo Gran capacidad de inserción (30 Kb) Expresión génica duradera	Difícil de manipular debido a su ciclo de vida complejo. Riesgo de reversión a virus silvestre. Pequeño tamaño de inserción (4 kb) y riesgo de mutagénesis insercional
	Vaccinia virus	Muy utilizado especialmente como agente oncolítico Se puede utilizar contra enfermedades infecciosas o tumores	Se requiere el uso de cepas altamente atenuadas para garantizar la seguridad de su uso con humanos
	Baculovirus	Vehículo alternativo y seguro para dirigir la terapia génica hacia células tumorales	Necesidad de modificarlo para mejorar su tropismo hacia células de mamífero

incrementa la inmunogenicidad del tumor o potencia la actividad antitumoral de las células del sistema inmune), y la proliferación de células tumorales se puede inhibir mediante una terapia antiangiogénesis²⁶ (fig. 2).

Terapia génica por compensación de mutaciones

Dado que la mayoría de mutaciones que conducen al desarrollo tumoral afectan a protooncogenes, genes supresores de tumor y genes reparadores del ADN²⁷, y teniendo en cuenta

que estas mutaciones son comunes a muchos tumores, el restablecimiento de su función normal puede ser diana de una terapia génica contra el cáncer²⁶. Por ejemplo, el gen p53, se encuentra mutado en más del 50% de tumores, y su expresión normal puede restablecerse mediante un adenovirus que codifique la copia silvestre del mismo (Ad-p53)²⁸⁻³⁴. En cáncer de próstata y de cuello uterino, Ad-p53 inhibe el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo*^{29,30,34}, y en osteosarcoma, incrementa la sensibilidad al cisplatino y la doxorubicina³¹.

Un ensayo preclínico en cáncer de pulmón demuestra que Ad-p53 induce la regresión tumoral con una toxicidad acep-

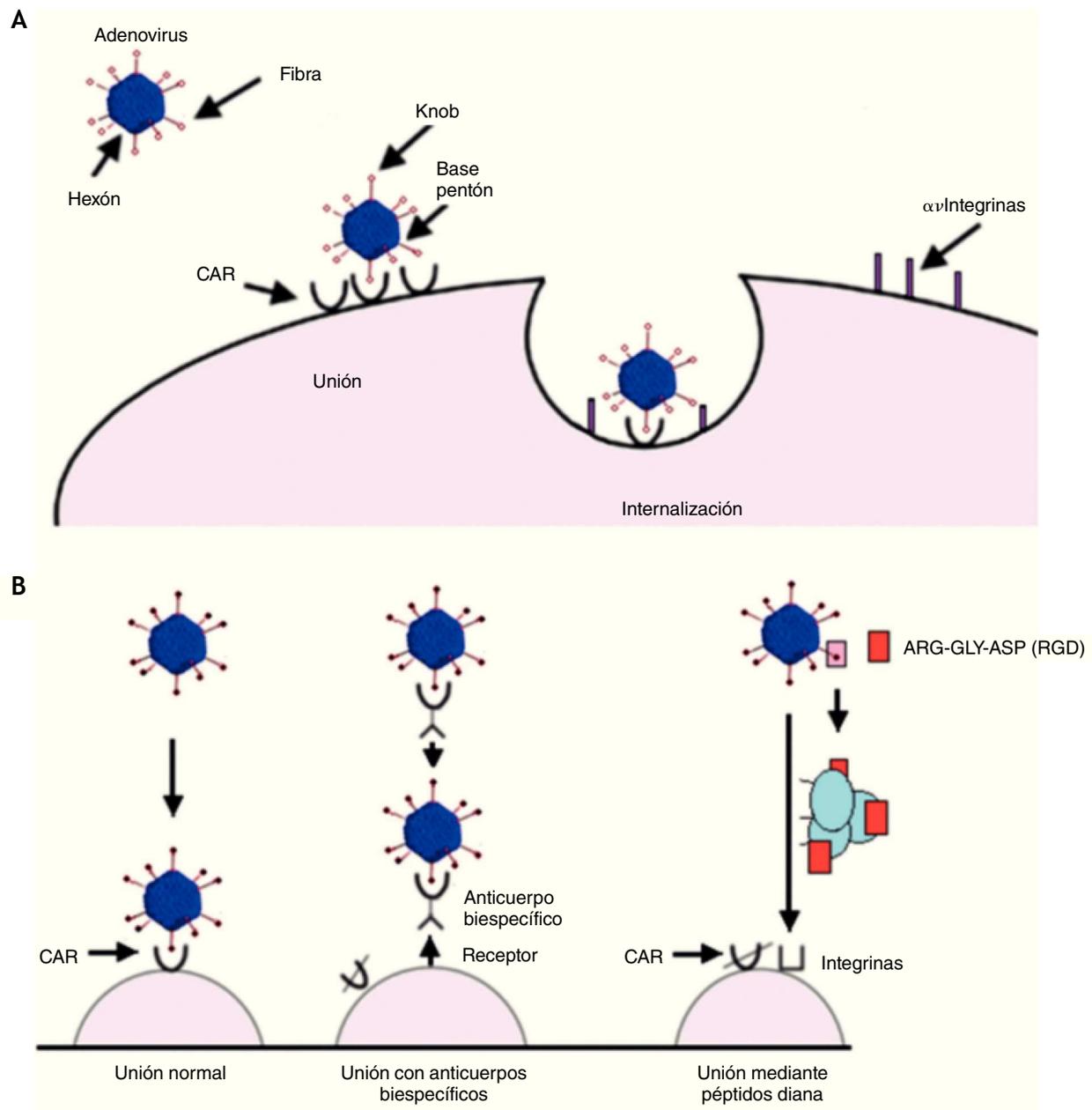


Figura 1 A. Representación esquemática de la unión e internalización de los adenovirus vía CAR e integrinas. B. Unión del adenovirus a la célula diana: unión normal y adaptaciones moleculares para mejorar la eficiencia de la transducción. Tomado de Witlox¹⁴.

table cuando se usa solo o en combinación con radioterapia y/o quimioterapia^{32,35}, y en carcinoma hepático, Ad-p53 combinado con TRAIL exógeno incrementa la muerte celular por apoptosis³³, lo que demuestra que Ad-p53 ejerce un efecto antitumoral sinérgico al administrarse combinado con los tratamientos tradicionales de quimio/radioterapia o con nuevos medicamentos antitumorales, maximizando la eliminación del tumor, y minimizando los efectos colaterales.

Debido al excelente perfil de seguridad y a los efectos antitumorales significativos obtenidos con estos vectores³⁶, se han conducido más de 100 ensayos clínicos (fase/I-III) utilizando Ad-p53. La primera patente de terapia génica uti-

lizando Ad-p53 (Gendicine[®]), contra el cáncer de cabeza y cuello, se aprobó en octubre de 2003. Posteriormente, se aprobó Oncorine[®], contra el carcinoma nasofaríngeo^{37,38}. Ambos vectores demostraron un efecto sinérgico antitumoral en combinación con radio/quimioterapia, cirugía o hipertermia³⁹. Posteriormente, se patentó Advexin[®], similar a Gendicine[®], cuya patente abarca cualquier adenovirus que porte p53 bajo el control de cualquier promotor⁴⁰.

Otro gen supresor tumoral frecuentemente mutado en cáncer, y por lo tanto candidato para la terapia génica, es el del retinoblastoma (Rb), que desempeña un importante papel en el control de la proliferación celular. Estudios preclí-

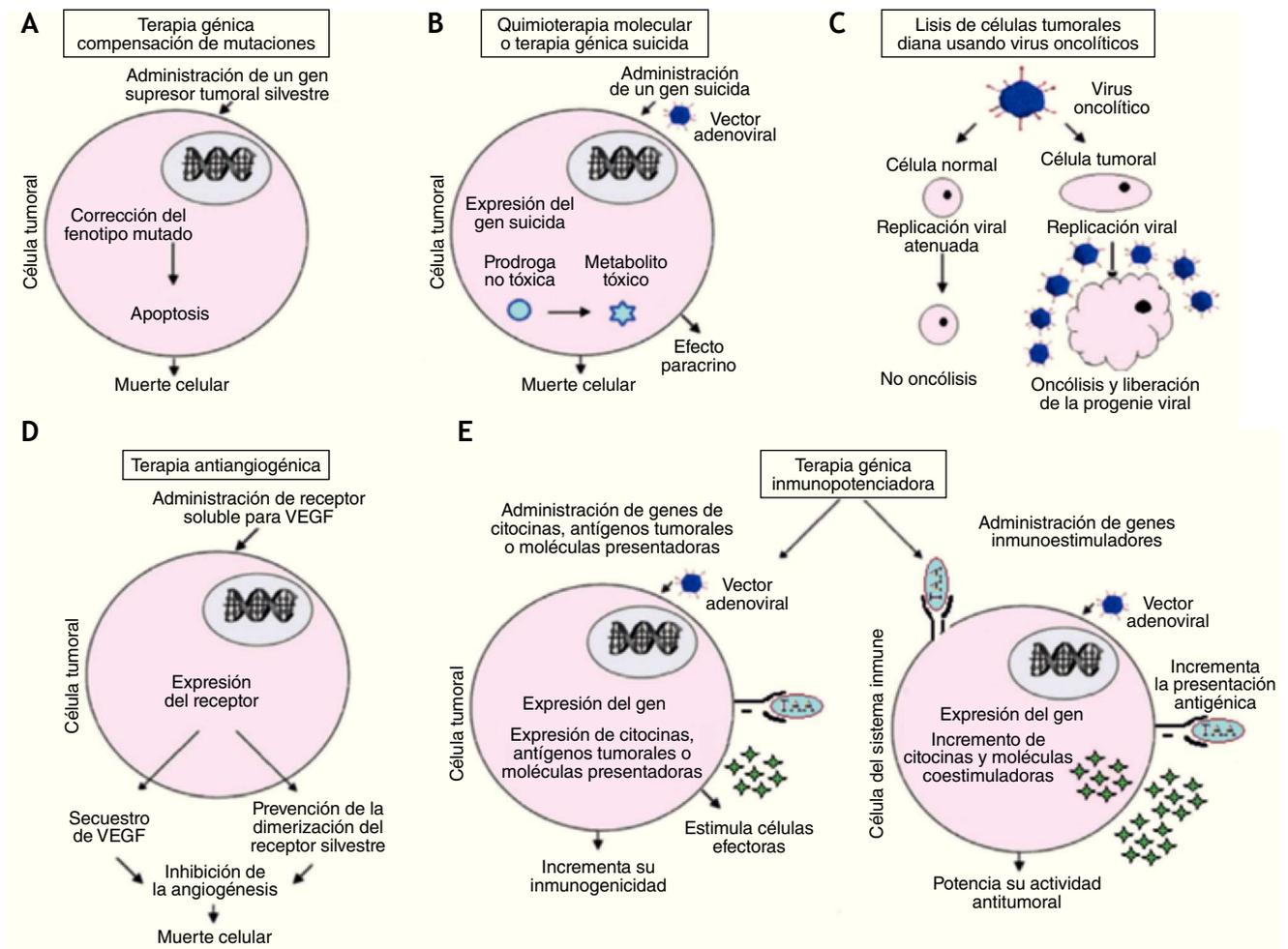


Figura 2 Diferentes enfoques de la terapia génica antitumoral mediada por adenovirus. A. Sustitución de un gen supresor tumoral mutado: resulta en apoptosis y muerte de la célula tumoral. B. Quimioterapia molecular o terapia génica suicida: la transfección y expresión de un gen suicida resulta en la conversión de una prodroga no tóxica en un metabolito citotóxico. C. Oncólisis viral: la infección viral del tumor resulta en la replicación viral, oncolisis, y liberación de los viriones a las células circundantes. D. Terapia génica antiangiogénesis: la transfección de un receptor soluble para factor de crecimiento endotelial vascular resulta en el secuestro del factor de crecimiento endotelial vascular y la subsecuente inhibición de la neovascularización. E. Terapia génica inmunopotenciadora: su blanco pueden ser las células tumorales o las del sistema inmune y resulta en el incremento de la inmunogenicidad o en la potenciación de la respuesta inmune, respectivamente. Adaptado con permiso de Macmillan Publishers Ltd³.

nicos en carcinoma escamocelular oral con adenovirus que portan la copia silvestre del gen Rb (Ad-RB110) demostraron la inhibición del crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo*⁴¹. Sin embargo, estudios realizados con un mutante de este gen, truncado en la región N-terminal (RB94), reportan mayor actividad antitumoral y supresión del crecimiento tumoral en varios tumores, incluido el cáncer de vejiga. Esta terapia activó mecanismos antitumorales como la erosión de los telómeros, la crisis cromosómica⁴², y la apoptosis independiente de activación de caspasas y de fragmentación del ADN⁴³. Dado que esta terapia no afecta a las células normales, se han ensayado sistemas virales y no virales para administrar de manera sistémica el mutante Rb94. Millikan et al. están evaluando la expresión de un plásmido que porta el gen

RB94 (SGT-94), encapsulado en liposomas en tumores sólidos Rb negativos, para demostrar que transfecta específicamente células tumorales, ocasiona muerte celular e incrementa la respuesta antitumoral de la quimio-radiación⁴⁴.

Otros mecanismos indispensables para mantener la homeostasis celular en los tejidos sanos son la apoptosis (muerte celular programada) y la autofagia (muerte celular programada de tipo II). Alteraciones en la expresión de las proteínas que controlan estos procesos favorecen el desarrollo tumoral y se asocian con el desarrollo de resistencia a las terapias tradicionales. Se puede inducir la muerte celular por apoptosis y sensibilizar a las células tumorales frente a los tratamientos tradicionales utilizando como diana proteínas de la familia Bcl-2 (Bcl-x[S], Bcl-x[AK],

Bik/Nbk y Bax) o ligandos de muerte relacionados con el factor de necrosis tumoral (CD95L/FasL, factor de necrosis tumoral α y TRAIL)⁴⁵; Igualmente, se puede inducir la autofagia mediante el restablecimiento de la expresión de XAF1 (*XIAP-associated factor-1*) con Adeno-XAF1 en células de cáncer gástrico⁴⁶. Cuando se combina esta terapia con TRAIL (Adeno-XIAP1/TRAIL), se observa un efecto sinérgico que resulta en la muerte por apoptosis⁴⁷.

Terapia génica suicida

La terapia génica suicida incrementa la susceptibilidad del tumor a la quimioterapia mediante la expresión de un gen suicida que codifica una enzima capaz de catalizar la conversión de un profármaco no tóxico en un metabolito tóxico potente y de corta duración con capacidad para difundir desde la célula tumoral en la que se produce y eliminar las células tumorales que la rodean (efecto *bystander*) tras la administración del profármaco, sin entrar en la circulación sistémica ni causar efectos secundarios⁴⁸.

Los sistemas suicidas (enzima/profármaco) más utilizados son: el gen de la timidina-cinasa del virus *Herpes simplex* (HSV-*tk*) (gen suicida), y como profármaco, el ganciclovir (GCV), cuyo producto metabólico tóxico es el deoxi-timidina trifosfato, un análogo de la purina que inhibe la ADN polimerasa e induce apoptosis como resultado del arresto del ciclo celular⁴⁹, y el gen de la citosina desaminasa (CD) de *Escherichia coli* (gen suicida), y 5-fluorocitocina (5-FC) (profármaco), cuyo metabolito tóxico es el 5-fluorouracilo⁴⁸. Se han desarrollado nuevos sistemas suicidas como el basado en el gen del citocromo P450 (gen suicida) y ciclofosfamida o isofosfamida como profármacos cuya actividad antitumoral se potencializa con la transferencia del gen del citocromo P450⁵⁰.

Numerosos ensayos preclínicos para el tratamiento de glioma^{51,52}, cáncer de vejiga⁵³, colon⁴⁶, gástrico⁵⁴ y pulmón⁵⁵, utilizando el sistema HSV-*tk*-GCV han arrojado resultados prometedores para aplicarlos a la clínica. En glioma de alto grado operable, se incrementó significativamente la supervivencia, y debido a que la citotoxicidad de este tratamiento en células normales es muy baja, se ha sugerido su posible utilización como tratamiento primario o adyuvante^{51,56}.

Puesto que el cáncer es el resultado de múltiples alteraciones genéticas, el desarrollo de terapias génicas que puedan utilizarse simultáneamente con otras es de gran importancia. Estudios con xenoinjertos de glioma humano en ratas permitieron demostrar que la terapia génica suicida en combinación con la terapia por compensación de mutaciones tiene mayor efecto antitumoral. El tratamiento simultáneo de HSV-*tk*/GCV y AdCMVp53 arrojó resultados similares a los obtenidos con la terapia suicida sola, utilizando únicamente la mitad de la dosis de GCV⁵².

Lisis de células tumorales usando adenovirus de replicación selectiva (oncólisis viral)

Los adenovirus son seguros, fáciles de manipular genéticamente y poseen ciclo de vida lítico, por lo cual, se han desarrollado variantes virales incapaces de replicarse en

células normales pero capaces de infectar y lisar efectivamente células tumorales⁵⁷. Una vez infectada la célula tumoral, el virus lítico se replica en su interior hasta que la lisa para liberar nuevas partículas virales que infectan las células tumorales vecinas, perpetuando los ciclos de infección, replicación y lisis mientras existan células tumorales que soporten la infección. Estos adenovirus actúan como un agente biológico antitumoral más que como vehículo para administrar genes terapéuticos, sin embargo, su efecto puede mejorarse al insertar genes de citocinas o enzimas^{58,59}.

Con el fin de dirigir su actividad oncolítica, se desarrollaron los adenovirus de replicación selectiva, mediante la depleción de funciones virales no necesarias en células tumorales y la substitución de promotores virales por promotores selectivos del tumor como la alfa-fetoproteína, el antígeno prostático específico, la kallikreína, la mucina 1 y la osteocalcina, entre otros^{60,61}.

El primer virus de replicación selectiva utilizado en ensayos clínicos aleatorios fue el ONYX-015, que permite la replicación y lisis de células tumorales deficientes en p53. Este vector demostró un nivel de eficacia satisfactorio en modelos preclínicos contra xenoinjertos de carcinoma de ovario humano deficiente de p53. Sin embargo, a pesar de su seguridad, su aplicación en un estudio clínico en mujeres con cáncer de ovario recurrente y refractario al tratamiento no mostró evidencia clara de respuesta clínica o radiológica en ningún paciente⁶².

En un estudio en fase II, tras haberse demostrado una modesta actividad antitumoral con el tratamiento oncolítico en pacientes con cáncer de cabeza y cuello⁶³, se observó que cuando las pacientes recibieron el tratamiento oncolítico combinado con quimioterapia (cisplatino y 5-fluorouracilo), tuvieron una respuesta completa sin progresión a los 6 meses de seguimiento, mientras que todos los tratados únicamente con quimioterapia, progresaron⁶⁴. Adicionalmente, un ensayo aleatorio de fase III, en el que se utilizó el adenovirus H101 en 160 pacientes con cáncer de cabeza y cuello o esófago, demostró que el tratamiento combinado con quimioterapia (cisplatino o adriamicina combinados con 5-fluorouracilo) duplica la respuesta y es bien tolerado^{65,66}.

La oncólisis viral puede combinarse con otras terapias génicas. El adenovirus oncolítico que porta E1A bajo el control del promotor de hTERT, y el gen suicida CD bajo el control del promotor del CMV (Ad.hTERT-E1A/CMV-CD) se replican selectivamente en células tumorales humanas e incrementan el efecto letal sobre células tumorales⁶⁷.

También se pueden diseñar virus que complementen su actividad oncolítica con la enzimática. El virus oncolítico (Ad5/3-Delta24-FCU1) es una quimera (Ad5/3) en la cual se reemplaza la fibra Knob del serotipo 5 por la del serotipo 3 para mejorar la eficiencia de transfección de los virus con cápside silvestre⁶⁸. Adicionalmente, tiene una depleción de 24-bp (Ad5/3- Δ 24) en la región constante del gen E1A que restringe su expresión a las células tumorales deficientes en Rb^{69,70}, y porta el gen FCU1 (Ad5/3-Delta24-FCU1) que codifica una enzima con doble actividad catalítica: metaboliza la 5-Fluorocitosina, en 5-fluorouracilo y monofosfato de 5-fluorouridina. Un estudio preclínico en carcinoma escamoso de cabeza y cuello mudo demostró el efecto antitumoral sinérgico cuando se administró el Ad5/3-Delta24FCU1 con

5-Fluorocitosina en comparación con los tratados sin el fármaco⁶⁴.

Terapia génica inmunopotenciadora

Dado que las células tumorales son poco inmunogénicas, y debido a que durante su desarrollo el cáncer no causa inflamación ni daño tisular (señales de peligro), no se activa una respuesta inmune efectiva que controle su crecimiento. La terapia génica inmunopotenciadora o vacunación genética en cáncer se ha desarrollado con base en la inducción de una inmunización activa que module los componentes celulares del sistema inmune e incremente su capacidad para reconocer y rechazar los antígenos tumorales. Esta estrategia solo es posible en tumores que expresen antígenos tumorales específicos⁷¹.

Numerosos ensayos clínicos se han centrado en la introducción de genes de citocinas estimuladoras como interleucina (IL)-2, IL-12 o interferón (fig. 2). Modelos de hepatocarcinoma en ratas tratadas con AdCMV-IL-12 demostraron una inhibición dosis-dependiente del crecimiento tumoral⁷², y en modelos murinos, se demostró que la cantidad de citocinas expresadas *de novo* en el tumor es importante, puesto que la regresión es mayor cuando el tratamiento se realiza con adenovirus que codifican la IL-2 bajo el control de un promotor fuerte (citomegalovirus) que cuando se realiza con adenovirus que la codifican bajo el control de un promotor débil como el del Rous Sarcoma Virus⁷³.

Las múltiples alteraciones que pueden estar presentes en un tumor dificultan la escogencia de un blanco molecular único para el tratamiento del cáncer. La posibilidad de transferir varios genes para estimular diferentes componentes de la inmunidad y ejercer un efecto aditivo se demostró en un modelo de mieloma múltiple *in vitro*, donde la transferencia de Ad-p53/GM-CSF/B7-1 indujo apoptosis, proliferación de linfocitos y citotoxicidad específica contra células tumorales²⁸. Adicionalmente, células del sistema inmune pueden modificarse para optimizar los protocolos de inmunopotenciación. Las más utilizadas son: presentadoras de antígeno y linfocitos infiltrantes de tumor (NK o LT citotóxicos específicos para antígenos tumorales)⁷⁴.

Terapia antiangiogénesis

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes como consecuencia del desbalance en la concentración de factores anti y proangiogénesis por parte de células endoteliales, monocitos, células de músculo liso y plaquetas. La angiogénesis, común a los tumores sólidos, es fundamental para la vascularización y el desarrollo del microambiente favorable que garantiza la supervivencia y progresión tumoral, y el desarrollo de metástasis⁷⁵. Su inducción requiere factores de crecimiento (factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, factor de crecimiento derivado de plaquetas), citocinas, (IL-1, IL-6, IL-8, factor de necrosis tumoral α) proteínas de la matriz extracelular (colágeno, endostatina, e integrinas) y enzimas proteolíticas (catepsina, activador del plasminógeno tipo

uroquinasa, y gelatinasas A y B), cuya expresión desequilibrada favorece la formación de vasos sanguíneos que irrigan el tumor. Un tumor incapaz de inducir la angiogénesis permanece en estado latente⁷⁶, por lo cual, una terapia antiangiogénesis conducirá a la muerte de las células tumorales al impedir su irrigación sanguínea⁷⁷.

Numerosos ensayos clínicos han demostrado que la endostatina es el inhibidor endógeno de la angiogénesis con mayor espectro antitumoral y menor toxicidad, por lo cual se aprobó su uso para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, no ha tenido mucha aplicación clínica por la dificultad para producirla a gran escala y por su inestabilidad *in vitro*. Se han desarrollado metodologías que permiten producir y purificar la endostatina humana recombinante mediante la infección de células Ad293 con el vector adenoviral Ad-rhEndo. Esta proteína es más efectiva y estable que la obtenida a partir de levaduras, y su administración no genera resistencia en modelos animales ni en humanos⁷⁸. Diferentes vectores que portan el gen de la endostatina han demostrado actividad antitumoral: el vector E10A incrementó significativamente el efecto inhibitor del crecimiento tumoral del cisplatino en xenoinjertos de carcinoma escamocelular de cabeza y cuello⁷⁹, y exhibió un excelente perfil de seguridad dado que cuando se evaluó su toxicidad, producción viral y respuesta antitumoral, se encontró que la inyección intratumoral de 1×10^{12} partículas virales por semana en pacientes con tumores sólidos ejerce un efecto antitumoral moderado y es bien tolerado⁸⁰.

También se han ensayado adenovirus recombinantes deficientes de replicación, que codifican las formas secretadas de endostatina: el rAd, que codifica la endostatina murina, inhibe la formación de vasos sanguíneos, la migración y proliferación de células endoteliales, e induce apoptosis en células del endotelio vascular *in vitro* e *in vivo*⁸¹; y el Ad-rhE que codifica la endostatina humana, genera una alta expresión de endostatina *in vivo*. Tanto el adenovirus como la proteína son metabolizados en el hígado⁸², y se está llevando a cabo un ensayo clínico de fase 1 para evaluar la seguridad y eficacia del adenovirus (Ad-rhE) en pacientes con tumores sólidos avanzados⁸³.

La inducción de un microambiente antioncogénico que anule el prooncogénico se puede lograr mediante la terapia génica. El vector Ad-HBx-mIL-12 combina la actividad antiangiogénesis e inhibidora de apoptosis de la proteína X del virus de la hepatitis B con la actividad de la IL-12, y en carcinoma hepatocelular, conduce a la acumulación masiva de células inmunes, la apoptosis de células tumorales y la reducción de los vasos sanguíneos angiogénicos⁸⁴.

Terapia génica neoadyuvante para el tratamiento tradicional del cáncer

La terapia génica en combinación con los tratamientos tradicionales (neoadyuvancia) mejora la respuesta clínica de los pacientes. Nokisalmi et al. analizaron la dosis de radiación, la modificación de la cápside viral y 5 diferentes promotores para el transgén con el fin de evaluar los mecanismos que median la sobreexpresión del transgén inducida por la radioterapia, y la respuesta al tratamiento combinado con adenovirus deficientes de replicación y radioterapia, en líneas celulares de cáncer de mama, próstata y pulmón. Un amplio rango de dosis de radiación incrementa la expre-

sión del transgén independientemente de la línea celular, el transgén, el promotor o la modificación de la cápside viral. La radiación induce una respuesta celular global y mayor producción de ARN y proteínas, incluidos los productos transgénicos del adenovirus⁸⁵.

La terapia génica suicida es un claro ejemplo de tratamiento neoadyuvante para mejorar la eficacia del tratamiento quimioterapéutico. Predina et al. reportaron una terapia génica con el sistema AdV-tk/GCV para el tratamiento neoadyuvante en carcinoma de esófago. La combinación entre cirugía, quimioterapia y AdV-tk/GCV mejora la supervivencia y disminuye la recurrencia de la enfermedad por el efecto citotóxico y el incremento del tráfico de células T-CD8 intratumorales⁸⁶. En la tabla 2 se muestran algunos ejemplos de ensayos clínicos que han sido desarrollados mediante las diferentes modalidades de terapia génica exclusiva o en combinación con las terapias convencionales.

Avances de los ensayos clínicos en terapia génica

Actualmente, se están llevando a cabo múltiples ensayos clínicos utilizando una gran variedad de enfoques terapéuticos

para el tratamiento del cáncer. Únicamente en los institutos nacionales de salud en Estados Unidos, se encuentran reportes de 1.886 ensayos clínicos con terapias génicas para el tratamiento del cáncer, de los cuales 81 están utilizando adenovirus.

Se han desarrollado múltiples agentes virales y no virales para la terapia génica del cáncer con resultados prometedores. En la actualidad, los adenovirus son los más populares y estudiados ya que, además de sus características deseables, han demostrado poseer un excelente récord de seguridad en pacientes con cáncer. Los adenovirus seguirán desarrollándose, y se descubrirá la manera de hacerlos más competitivos al minimizar el efecto de los factores limitantes para su desarrollo y utilización en el tratamiento del cáncer.

Factores como la imposibilidad para identificar un único gen que funcione en una terapia antitumoral, la falta de selectividad hacia el tumor, la corta duración de la expresión del gen terapéutico⁸⁷, la dificultad para transfectar toda la masa tumoral y la fuerte respuesta inmune antiviral generada en el hospedero son las principales limitaciones para la aplicación de la terapia génica^{88,89}.

Dado que inicialmente se determinó que la respuesta inmune antiviral y la falta de selectividad hacia el tumor

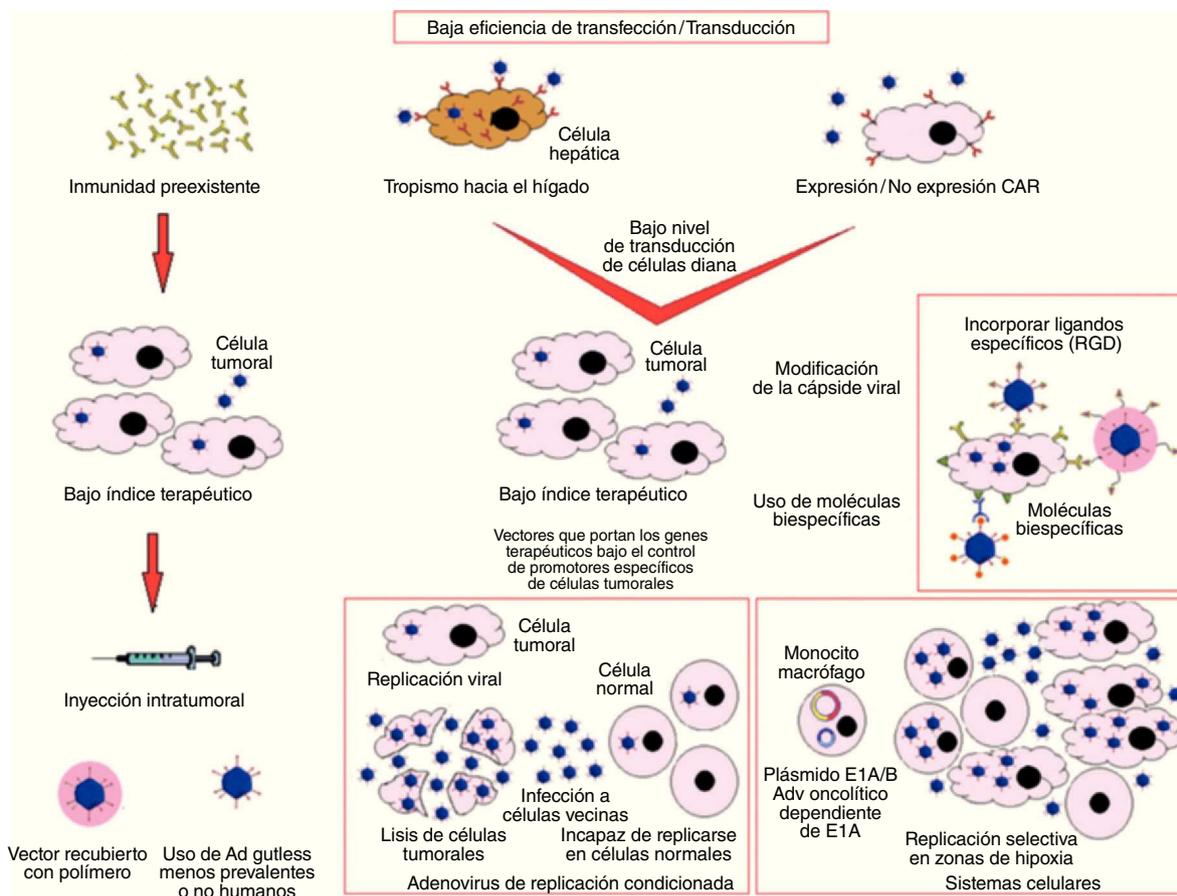


Figura 3 Factores que limitan la aplicación de la terapia génica y estrategias empleadas para minimizar su efecto: la inmunidad preexistente, el tropismo viral hacia el hígado y la falta de selectividad del vector hacia las células tumorales son los principales obstáculos para una terapia génica efectiva. Estas dificultades pueden superarse mediante la construcción de adenovirus modificados para disminuir su inmunogenicidad, mejorar la eficiencia de la transfección y hacerlos selectivos de las células tumorales.

Tabla 2 Algunos ejemplos de ensayos clínicos llevados a cabo mediante diferentes modalidades de terapia génica

Estrategia	Estudio	Objetivos	Intervenciones	Patrocinador/ País/Referencia	Tipo de cáncer	Fase/Estado general
Oncólisis viral	Terapia génica con ONYX-015 combinado con cisplatino y fluorouracilo en pacientes con cáncer escamocelular de cabeza y cuello avanzado	Determinar factibilidad y dosis máxima de ONYX-015 Determinar distribución de ONYX-015 en biopsia tumoral y de mucosa normal Determinar respuesta a ONYX-015 solo, o en combinación con cisplatino y fluorouracilo	Droga: cisplatino Droga: fluorouracilo Biológico: ONYX-015	Patrocinador: National Cancer Institute Colaborador: Dana-Farber Cancer Institute País: Estados Unidos http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00006106	Cabeza/cuello Ovario Hígado Páncreas	Fase 1 Suspendido
	Terapia génica con CV787, en pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente al tratamiento hormonal	Determinar la seguridad, tolerabilidad y dosis máxima de la inyección intravenosa de CG7870 Evaluar tasa y duración de la respuesta, farmacocinética sistémica y respuesta inmune frente al CG7870 en cáncer de próstata resistente a tratamiento hormonal	Biológico: CG7870 adenovirus citolítico específico del (PSA) antígeno específico de la próstata	Patrocinador: Cell Genesys http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00116155 Hum Gene Ther. 2001;12:219-26	Próstata metastásico	Fase 1/2 Completo
Compensación de mutaciones	Terapia génica con rAd-p53 solo, o combinado con yodo radioactivo o cirugía para cáncer avanzado de tiroides	Determinar perfiles de eficacia de la inyección IT* de rAd-p53 solo, combinado con yodo radioactivo o con cirugía	Droga: rAd-p53 Procedimiento: cirugía Radiación: yodo radioactivo precirugía	Patrocinador: Shnzhen SiBiono GeneTech Co.,Ltd. China http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00902122	Tiroides avanzado (III-IV)	Fase 4 Reclutando
	Terapia génica con Adp53 para el glioma maligno	Determinar el efecto biológico molecular, la dosis máxima tolerada y la toxicidad de la administración IT* de Ad-p53 en pacientes con glioma maligno	Biológico: Ad5CMV-p53 Procedimiento: cirugía convencional	Patrocinador: North American Brain Tumor Consortium Colaborador: National Cancer Institute http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00004041	Glioma maligno	Fase 1 Completado

Tabla 2 Algunos ejemplos de ensayos clínicos llevados a cabo mediante diferentes modalidades de terapia génica (*Continuación*)

Estrategia	Estudio	Objetivos	Intervenciones	Patrocinador/ País/Referencia	Tipo de cáncer	Fase/Estado general
Terapia génica suicida	Terapia génica suicida con Ad5-yCD/mutTKSR39 rep-ADP, solo, o con IMRT para el cáncer de próstata	Probar que el tratamiento con adenovirus competentes de replicación + radioterapia de intensidad modulada logra una mejor respuesta que la obtenida con IMRT sola en pacientes con cáncer de próstata	Biológico: Ad5-yCD/ mutTKSR39 rep-ADP Prodroga: 5-FC y GCV Radiación: IMRT 40 × 2 Gy	Patrocinador: Henry Ford Health System http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00583492 Mol Ther. 2007;15:636-42. Mol Ther. 2007;15:1016-23	Próstata	Fase 2/3 Activo, no reclutando
	Terapia génica para cáncer hepatocelular por inyección IT* de pAd-TK99UN	Determinar si la activación de la prodroga después de la transferencia génica IT* es segura en humanos Determinar las dosis para su posible uso clínico Evaluar la inyección IT* de adenovirus defectivos de replicación conteniendo el HSVtk en pacientes con cáncer de hígado sin posibilidad de tratamiento curativo	Biológico: inyección IT de TK99UN Dosis desde 2 × 10 ¹⁰ hasta 2 × 10 ¹² partículas virales	Patrocinador: Clínica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00844623 Cancer Gene Ther. 2010;17:837-43	Hígado	Fase 1 Completado
Inmunoterapia génica	Administración IT* de adenovirus portando el gen de la IL-12 humana en pacientes con cáncer de mama metastásico	Determinar la toxicidad y máxima dosis tolerada, respuesta al tratamiento y respuesta inmune de la inyección IT* de adenovirus portando el gen de la IL-12 humana en mujeres con cáncer de mama metastásico	Biológico: Adenovirus portando el gen de la IL-12 humana	Patrocinador: Mount Sinai School of Medicine http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00849459	Mama	Fase 1 Reclutamiento
	Inmunoterapia génica con AdCD40L para el tratamiento de melanoma metastásico	Investigar la seguridad, y efectividad de la terapia génica inmunoestimuladora mediada por un adenovirus que porta el gen del CD40L en pacientes con melanoma metastásico Evaluar la respuesta inmune frente a la propagación del vector	Biológico: AdCD40L (serotipo 5 depletado en E1/E3 que porta el gen del CD40L bajo el control del promotor del RSV)	Patrocinador: Universidad de Uppsala http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT01455259		Fase 1/2a reclutamiento

Tabla 2 Algunos ejemplos de ensayos clínicos llevados a cabo mediante diferentes modalidades de terapia génica (Continuación)

Estrategia	Estudio	Objetivos	Intervenciones	Patrocinador/ País/Referencia	Tipo de cáncer	Fase/Estado general
Terapia antiangiogénesis	E10A para el cáncer de cabeza y cuello	Explorar la seguridad y efectividad de E10A combinado con quimioterapia para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello	<p>Biológico: inyección IT de E10A</p> <p>Druga: cisplatino</p> <p>Druga: paclitaxel</p>	<p>Patrocinador: Universidad Sun Yat-sen</p> <p>Colaborador: Double Bioproduct Inc http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00634595</p> <p>Cancer Biol Ther. 2007;6:648-53. Publicación electrónica 13 Feb 2007</p>	Cabeza y cuello	Fase 2 Reclutamiento
	Ad-rhE para el tratamiento de tumores sólidos avanzados	Probar la seguridad y eficacia del adenovirus recombinante para endostatina humana (Ad-rhE) para el tratamiento de pacientes con tumores sólidos	<p>Druga: antiangiogénesis</p> <p>Biológico: adenovirus portando el gen de la endostatina humana</p>	<p>Patrocinador: Universidad Sun Yat-sen</p> <p>Colaborador Double Bioproduct Inc http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00262327</p>	Tumores sólidos	Fase 1 Activo, no reclutando

*IT: intratumoral.

eran las principales limitaciones para la administración del vector terapéutico⁹⁰, se diseñaron vectores capaces de garantizar la llegada del virus al tumor, la activación de la respuesta inmune antitumoral y la infección selectiva de las células tumorales. Los adenovirus dependientes de virus auxiliar (*gutless*) poseen amplias depleciones del genoma, por lo que expresan pocas proteínas virales y no inducen una respuesta inmune vigorosa *in vivo*. Adicionalmente, mantienen su tropismo y la eficiencia para la transducción y expresión del gen terapéutico⁹¹.

La vía de administración juega un papel importante en la respuesta al tratamiento con adenovirus recombinantes. La inyección intratumoral del interferón –mediante un adenovirus– induce mayor inmunidad antitumoral y genera menor toxicidad que la inyección intravenosa del mismo vector⁹². Un ensayo clínico de fase 1 evaluó la eficacia terapéutica, biodistribución y neurotoxicidad de los adenovirus de gran capacidad (HC-Ad) en ratas con glioblastoma y demostró que su administración intratumoral induce inmunidad sistémica antiadenovirus sin afectar a su eficacia terapéutica⁹³. Para salvar la dificultad de la selectividad hacia el tumor, se diseñaron vectores con los genes terapéuticos bajo el control de promotores específicos de células tumorales como hTERT⁶⁷, PMSA⁹⁴ o survivina⁵⁴, o con motivos que permiten visualizar el virus (mRFP1) y que lo dirigen a la célula diana (polilisina), donde ejerce el efecto terapéutico (HSV-1/TK)⁸⁷.

Avances como el desarrollo de sistemas celulares monocito-macrófagos para administrar adenovirus oncolíticos en zonas de hipoxia en tumores de próstata permitieron utilizar 3 niveles de especificidad: el *homming* de los macrófagos en zonas de hipoxia, la inducción de proliferación viral en el macrófago por hipoxia y la replicación selectiva del virus en células tumorales de próstata. Este sistema permitió la transducción de células tumorales en zonas de hipoxia y en las metástasis, que son difíciles de transfectar⁹⁵.

Muchos factores resultan en una baja eficiencia de transfección: el tropismo viral hacia el hígado, los anticuerpos preexistentes, la gran variedad de células que expresan el receptor coxsackie/adenovirus y la no expresión del receptor coxsackie/adenovirus en algunas células. Estas dificultades pueden salvarse mediante diversas estrategias de terapia génica (figs. 1B y 3)⁹⁴.

Por último, si se considera que tumores como el cáncer colorrectal hereditario no poliposo, normalmente posee mutaciones en los genes de la maquinaria de reparación de apareamientos erróneos, y que este “fenotipo mutador” puede anular el efecto de la transferencia génica, se podría pensar en una terapia génica que además del gen terapéutico incluya la copia silvestre del gen de la reparación de apareamientos erróneos que esté alterado (MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2) para revertir el fenotipo mutador.

Conclusiones

La terapia génica es un grupo de modalidades terapéuticas únicas proyectadas para introducir ácidos nucleicos en las células y reemplazar material genético defectuoso o perdido para tratar o curar una enfermedad. Estas terapias, que inicialmente arrojaron resultados inesperados que justificaron su fuerte regulación para garantizar su seguridad, han demostrado una clara evidencia de su eficacia terapéutica

con una toxicidad extraordinariamente menor que la generada por los tratamientos tradicionales.

Se espera que durante la próxima década se aprueben y regulen diferentes terapias génicas para el tratamiento del cáncer, aunque los resultados preclínicos en modelos animales no son muy alentadores. La mayoría del trabajo preclínico se realiza por xenoinjerto en animales inmunosuprimidos cuyos resultados no se pueden extrapolar a los que se obtendrían en un animal inmunocompetente. Incluso si se contara con modelos inmunocompetentes, los datos obtenidos pueden no ser extrapolables a los seres humanos.

Queda mucho por aprender sobre la biología de la terapia génica viral en pacientes con cáncer. Aunque existe evidencia del potencial terapéutico y de la seguridad en el uso de estos agentes terapéuticos, la mayor conclusión de los ensayos clínicos que se han llevado a cabo es que la penetración del tumor y la eficiencia de transducción son muy bajas para permitir un efecto antitumoral significativo. Actualmente, se están llevando a cabo numerosos estudios que permitirán desarrollar vectores más eficientes que generen una inmunidad antitumoral sistémica reforzada por la respuesta antiviral que genere el vector terapéutico.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Ferlay J. SHBFFDMCaPD. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base. 2;10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer: 2008.
2. Giacca M, Zacchigna S. Virus-mediated gene delivery for human gene therapy. *J Control Release*. 2012;161:377-88.
3. Raki M, Rein DT, Kanerva A, Hemminki A. Gene transfer approaches for gynecological diseases. *Mol Ther*. 2006;14:154-63.
4. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*. 1995;270:475-80.
5. Muul LM, Tuschong LM, Soenen SL, Jagadeesh GJ, Ramsey WJ, Long Z, et al. Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial. *Blood*. 2003;101:2563-9.
6. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint BG, Gross F, Yvon E, Nussbaum P, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*. 2000;288:669-72.
7. Cavazzana-Calvo M, Fischer A. Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest*. 2007;117:1456-65.
8. Hacein-Bey-Abina S, Von KC, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003;302:415-9.
9. Fujii N, Isaka Y, Takabatake Y, Mizui M, Suzuki C, Takahara S, et al. Targeting of interstitial cells using a simple gene-transfer strategy. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21:2745-53.
10. Isaka Y. Gene therapy targeting kidney diseases: routes and vehicles. *Clin Exp Nephrol*. 2006;10:229-35.
11. Sharma A, Tandon M, Bangari DS, Mittal SK. Adenoviral vector-based strategies for cancer therapy. *Curr Drug Ther*. 2009;4:117-38.
12. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:7413-7.
13. Jeschke MG, Barrow RE, Hawkins HK, Yang K, Hayes RL, Lichtenbelt BJ, et al. IGF-I gene transfer in thermally injured rats. *Gene Ther*. 1999;6:1015-20.
14. Witlox MA, Lamfers ML, Wuisman PI, Curiel DT, Siegal GP. Evolving gene therapy approaches for osteosarcoma using viral vectors: review. *Bone*. 2007;40:797-812.
15. Bleiziffer O, Eriksson E, Yao F, Horch RE, Kneser U. Gene transfer strategies in tissue engineering. *J Cell Mol Med*. 2007;11:206-23.
16. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med*. 2001;7:33-40.
17. McConnell MJ, Imperiale MJ. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2004;15:1022-33.
18. Nadeau I, Kamen A. Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnol Adv*. 2003;20:475-89.
19. Li J, Zeng W, Huang Y, Zhang Q, Hu P, Rabkin SD, et al. Treatment of breast cancer stem cells with oncolytic herpes simplex virus. *Cancer Gene Ther*. 2012;19:707-14.
20. Ni TH, McDonald WF, Zolotukhin I, Melendy T, Waga S, Stillman B, et al. Cellular proteins required for adeno-associated virus DNA replication in the absence of adenovirus coinfection. *J Virol*. 1998;72:2777-87.
21. Melero I, Vile RG, Colombo MP. Feeding dendritic cells with tumor antigens: self-service buffet or a la carte? *Gene Ther*. 2000;7:1167-70.
22. Moniri MR, Sun XY, Rayat J, Dai D, He Z, Verchere CB, et al. TRAIL-engineered pancreas-derived mesenchymal stem cells: characterization and cytotoxic effects on pancreatic cancer cells. *Cancer Gene Ther*. 2012;19:652-8.
23. Ochsenreither S, Majeti R, Schmitt T, Stirewalt D, Keilholz U, Loeb KR, et al. Cyclin-A1 represents a new immunogenic targetable antigen expressed in acute myeloid leukemia stem cells with characteristics of a cancer-testis antigen. *Blood*. 2012;119:5492-501.
24. Anderson WF. Human gene therapy. *Science*. 1992;256:808-13.
25. Cheng L, Ziegelhoffer PR, Yang NS. In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:4455-9.
26. Sangro B, Herraiz M, Prieto J. Gene therapy of neoplastic liver diseases. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003;35:135-48.
27. Casado E, Nettelbeck DM, Gomez-Navarro J, Hemminki A, Gonzalez Baron M, Siegal GP, et al. Transcriptional targeting for ovarian cancer gene therapy. *Gynecol Oncol*. 2001;82:229-37.
28. Ren SP, Wu CT, Huang WR, Lu ZZ, Kia XX, Wang L, et al. Adenoviral-mediated transfer of human wild-type p53, GM-CSF and B7-1 genes results in growth suppression and autologous anti-tumor cytotoxicity of multiple myeloma cells in vitro. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55:375-85.
29. Ahn WS, Bae SM, Lee KH, Lee JM, Namkoong SE, Chun HJ, et al. Recombinant adenovirus-p53 gene transfer and cell-specific growth suppression of human cervical cancer cells in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol*. 2004;92:611-21.
30. Ahn WS, Bae SM, Lee JM, Namkoong SE, Yoo JY, Seo YS, et al. Anti-cancer effect of adenovirus p53 on human cervical cancer cell growth in vitro and in vivo. *Int J Gynecol Cancer*. 2004;14:322-32.
31. Ganjavi H, Gee M, Narendran A, Parkinson N, Krishnamoorthy M, Freedman MH, et al. Adenovirus-mediated p53 gene therapy

- in osteosarcoma cell lines: sensitization to cisplatin and doxorubicin. *Cancer Gene Ther.* 2006;13:415-9.
32. Swisher SG, Roth JA. p53 Gene therapy for lung cancer. *Curr Oncol Rep.* 2002;4:334-40.
 33. Inoue H, Shiraki K, Murata K, Sugimoto K, Kawakita T, Yamaguchi Y, et al. Adenoviral-mediated transfer of p53 gene enhances TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Mol Med.* 2004;14:271-5.
 34. Yang C, Cirielli C, Capogrossi MC, Passaniti A. Adenovirus-mediated wild-type p53 expression induces apoptosis and suppresses tumorigenesis of prostatic tumor cells. *Cancer Res.* 1995;55:4210-3.
 35. El-Deiry WS. The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene.* 2003;22:7486-95.
 36. Roth JA. Adenovirus p53 gene therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2006;6:55-61.
 37. Ma G, Shimada H, Hiroshima K, Tada Y, Suzuki N, Tagawa M. Gene medicine for cancer treatment: commercially available medicine and accumulated clinical data in China. *Drug Des Devel Ther.* 2009;2:115-22.
 38. Shi J, Zheng D. An update on gene therapy in China. *Curr Opin Mol Ther.* 2009;11:547-53.
 39. Peng Z. Current status of gene therapy in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther.* 2005;16:1016-27.
 40. INGN 201: Ad-p53, Ad5CMV-p53, adenoviral p53, p53 gene therapy-introgen, RPR/INGN 201. *Drugs R.D.* 2007;8:176-87.
 41. Zhang X, Liu S, Liang C, Yang H. Adenovirus-mediated Rb gene transfect for head and neck cancer. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2001;32:194-5, 207.
 42. Zhang X, Multani AS, Zhou JH, Shay JW, McConkey D, Dong L, et al. Adenoviral-mediated retinoblastoma 94 produces rapid telomere erosion, chromosomal crisis, and caspase-dependent apoptosis in bladder cancer and immortalized human urothelial cells but not in normal urothelial cells. *Cancer Res.* 2003;63:760-5.
 43. Zhou J, Zhang XQ, Ashoori F, McConkey DJ, Knowles MA, Dong L, et al. Early RB94-produced cytotoxicity in cancer cells is independent of caspase activation or 50 kb DNA fragmentation. *Cancer Gene Ther.* 2009;16:13-9.
 44. Millikan RE, Perez CA. A Phase I Study of Systemic Gene Therapy With SGT-94 in Patients With Solid Tumors. [Internet]. 27 Jul 2012.
 45. Eberle J, Fecker LF, Hossini AM, Kurbanov BM, Fechner H. Apoptosis pathways and oncolytic adenoviral vectors: promising targets and tools to overcome therapy resistance of malignant melanoma. *Exp Dermatol.* 2008;17:1-11.
 46. Kagaya T, Nakamoto Y, Sakai Y, Tsuchiyama T, Yagita H, Mukaida N, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 gene delivery enhances antitumor effects of herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in a model of colon cancer. *Cancer Gene Ther.* 2006;13:357-66.
 47. Tu SP, Liston P, Cui JT, Lin MC, Jiang XH, Yang Y, et al. Restoration of XAF1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in gastric cancer. *Int J Cancer.* 2009;125:688-97.
 48. Dachs GU, Tupper J, Tozer GM. From bench to bedside for gene-directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Anticancer Drugs.* 2005;16:349-59.
 49. Wang J, Lu XX, Chen DZ, Li SF, Zhang LS. Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir suicide gene therapy for human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2004;10:400-3.
 50. Chen L, Waxman DJ. Cytochrome P450 gene-directed enzyme prodrug therapy (GDEPT) for cancer. *Curr Pharm Des.* 2002;8:1405-16.
 51. Maatta AM, Samaranayake H, Pikkarainen J, Wirth T, Yla-Herttuala S. Adenovirus mediated herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy for resectable malignant glioma. *Curr Gene Ther.* 2009;9:356-67.
 52. Huang Q, Pu P, Xia Z, You Y. Exogenous wt-p53 enhances the antitumor effect of HSV-TK/GCV on C6 glioma cells. *J Neurooncol.* 2007;82:239-48.
 53. Huang H, Tan WL, Zhu WH, Liang ZK. Lethal effect of adenovirus-mediated HSV-TK gene in combination with hydroxycamptothecin on human bladder cancer in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2007;27:461-4.
 54. Luo XR, Li JS, Niu Y, Miao L. Adenovirus-mediated double suicide gene selectively kills gastric cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13:781-4.
 55. Maatta AM, Tenhunen A, Pasanen T, Meriläinen O, Pellinen R, Mäkinen K, et al. Non-small cell lung cancer as a target disease for herpes simplex type 1 thymidine kinase-ganciclovir gene therapy. *Int J Oncol.* 2004;24:943-9.
 56. Immonen A, Vapalahti M, Tyynelä K, Hurskainen H, Sandmair A, Vanninen R, et al. AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomized, controlled study. *Mol Ther.* 2004;10:967-72.
 57. Sviatchenko VA, Tarasova MV, Netesov SV, Chumakov PM. Oncolytic adenoviruses in anti-cancer therapy: current status and perspectives. *Mol Biol (Mosk).* 2012;46:556-69.
 58. Wildner O. Comparison of replication-selective, oncolytic viruses for the treatment of human cancers. *Curr Opin Mol Ther.* 2003;5:351-61.
 59. Wildner O, Hoffmann D, Jogler C, Uberla K. Comparison of HSV-1 thymidine kinase-dependent and -independent inhibition of replication-competent adenoviral vectors by a panel of drugs. *Cancer Gene Ther.* 2003;10:791-802.
 60. Alemany R, Balague C, Curiel DT. Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol.* 2000;18:723-7.
 61. Curiel DT. Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;886:158-71.
 62. Vasey PA, Shulman LN, Campos S, Davis J, Gore M, Johnston S, et al. Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20:1562-9.
 63. Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, Arseneau J, Posner M, Vokes E, et al. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2001;19:289-98.
 64. Dias JD, Liikanen I, Guse K, Foloppe J, Sloniecka M, Diaconu I, et al. Targeted chemotherapy for head and neck cancer with a chimeric oncolytic adenovirus coding for bifunctional suicide protein FCU1. *Clin Cancer Res.* 2010;16:2540-9.
 65. Yu W, Fang H. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007;7:141-8.
 66. Xia ZJ, Chang JH, Zhang L, Jiang WQ, Guan ZZ, Liu JW, et al. Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus. *Ai Zheng.* 2004;23:1666-70.
 67. Zhang J, Wei F, Wang H, Li H, Qiu W, Ren P, et al. A novel oncolytic adenovirus expressing Escherichia coli cytosine deaminase exhibits potent antitumor effect on human solid tumors. *Cancer Biother Radiopharm.* 2010;25:487-95.
 68. Dias JD, Guse K, Nokisalmi P, Eriksson M, Chen DT, Diaconu I, et al. Multimodal approach using oncolytic adenovirus, cetuximab, chemotherapy and radiotherapy in HNSCC low passage tumour cell cultures. *Eur J Cancer.* 2010;46:625-35.
 69. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Mitlianga P, et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene.* 2000;19:2-12.

70. Heise C, Hermiston T, Johnson L, Brooks G, Sampson-Johannes A, Williams A, et al. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med.* 2000;6:1134-9.
71. Tuting T, Storkus WJ, Lotze MT. Gene-based strategies for the immunotherapy of cancer. *J Mol Med (Berl).* 1997;75:478-91.
72. Barajas M, Mazzolini G, Genové G, Bilbao R, Narvaiza I, Schmitz V, et al. Gene therapy of orthotopic hepatocellular carcinoma in rats using adenovirus coding for interleukin 12. *Hepatology.* 2001;33:52-61.
73. Slos P, De MM, Leroy P, Rousseau C, Acres B. Immunotherapy of established tumors in mice by intratumoral injection of an adenovirus vector harboring the human IL-2 cDNA: induction of CD8(+) T-cell immunity and NK activity. *Cancer Gene Ther.* 2001;8:321-32.
74. Nakamura M, Iwahashi M, Nakamori M, Ueda K, Matsuura I, Noguchi K, et al. Dendritic cells genetically engineered to simultaneously express endogenous tumor antigen and granulocyte macrophage colony-stimulating factor elicit potent therapeutic antitumor immunity. *Clin Cancer Res.* 2002;8:2742-9.
75. Volpert OV, Dameron KM, Bouck N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene.* 1997;14:1495-502.
76. Ribatti D, Vacca A, Presta M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol.* 2000;35:227-31.
77. Denekamp J, Dasu A, Waites A. Vasculature and micro-environmental gradients: the missing links in novel approaches to cancer therapy? *Adv Enzyme Regul.* 1998;38:281-99.
78. Liang Z, Wu J, Huang J, Tan W, Ke M, Liu R, et al. Bioactivity and stability analysis of endostatin purified from fermentation supernatant of 293 cells transfected with Ad/rhEndo. *Protein Expr Purif.* 2007;56:205-11.
79. Adhim Z, Lin X, Huang W, Morishita N, Nakamura T, Yasui H, et al. E10A, an adenovirus-carrying endostatin gene, dramatically increased the tumor drug concentration of metronomic chemotherapy with low-dose cisplatin in a xenograft mouse model for head and neck squamous-cell carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2012;19:144-52.
80. Lin X, Huang H, Li S, Li H, Li Y, Cao Y, et al. A phase I clinical trial of an adenovirus-mediated endostatin gene (E10A) in patients with solid tumors. *Cancer Biol Ther.* 2007;6:648-53.
81. Jin X, Bookstein R, Wills K, Avanzini J, Tsai V, LaFace D, et al. Evaluation of endostatin antiangiogenesis gene therapy in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther.* 2001;8:982-9.
82. He GA, Xue G, Xiao L, Wu JX, Xu BL, Huang JL, et al. Dynamic distribution and expression in vivo of human endostatin gene delivered by adenoviral vector. *Life Sci.* 2005;77:1331-40.
83. Wenqi Jiang. Phase I Trial of Intratumoral Injection of an Adenovirus Encoding Human Endostatin for Advanced Solid Tumors. [Internet] 20 Ago 2013. [ClinicalTrials.gov](http://ClinicalTrials.gov/ct2/show/study/NCT01311111)
84. He H, Fan P, Yin T, Chen Q, Shi H, Liu S, et al. Local delivery of recombinant adenovirus expressing hepatitis B virus X protein and interleukin-12 results in antitumor effects via inhibition of hepatoma cell growth and intervention of tumor microenvironment. *Int J Mol Med.* 2012;30:599-605.
85. Nokisalmi P, Rajecki M, Pesonen S, Escutenaire S, Soliymani R, Tenhunen M, et al. Radiation-induced upregulation of gene expression from adenoviral vectors mediated by DNA damage repair and regulation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012;83:376-84.
86. Predina JD, Judy B, Aliperti LA, Fridlender ZG, Blouin A, Kapoor V, et al. Neoadjuvant in situ gene-mediated cytotoxic immunotherapy improves postoperative outcomes in novel syngeneic esophageal carcinoma models. *Cancer Gene Ther.* 2011;18:871-83.
87. Tang Y, Wu H, Ugai H, Matthews QL, Curiel DT. Derivation of a triple mosaic adenovirus for cancer gene therapy. *PLoS One.* 2009;4:e8526.
88. Appledorn DM, Patial S, McBride A, Godbehere S, Van Rooijen N, Parameswaran N, et al. Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, MAPK signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 in vivo. *J Immunol.* 2008;181:2134-44.
89. Appledorn DM, Kiang A, McBride A, Jiang H, Seregin S, Scott JM, et al. Wild-type adenoviruses from groups A-F evoke unique innate immune responses, of which HAd3 and SAd23 are partially complement dependent. *Gene Ther.* 2008;15:885-901.
90. Kaufmann JK, Nettelbeck DM. Virus chimeras for gene therapy, vaccination, and oncolysis: adenoviruses and beyond. *Trends Mol Med.* 2012;18:365-76.
91. Alba R, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther.* 2005;12 Suppl 1:S18-S27.
92. Narumi K, Kondoh A, Udagawa T, Hara H, Goto N, Ikarashi Y, et al. Administration route-dependent induction of antitumor immunity by interferon-alpha gene transfer. *Cancer Sci.* 2010;101:1686-94.
93. Muhammad AK, Puntel M, Candolfi M, Salem A, Yagiz K, Farrokhi C, et al. Study of the efficacy, biodistribution, and safety profile of therapeutic gutless adenovirus vectors as a prelude to a phase I clinical trial for glioblastoma. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;88:204-13.
94. Williams BJ, Bhatia S, Adams LK, Boling S, Carroll JL, Li XL, et al. Dendritic cell based PSMA immunotherapy for prostate cancer using a CD40-targeted adenovirus vector. *PLoS One.* 2012;7:e46981.
95. Muthana M, Giannoudis A, Scott SD, Fang HY, Coffelt SB, Morrow FJ, et al. Use of macrophages to target therapeutic adenovirus to human prostate tumors. *Cancer Res.* 2011;71:1805-15.