

ORIGINAL PAPERS

Antisense gene therapy using anti-k-ras and antitelomerase oligonucleotides in colorectal cancer

S. Lledó, R. Alfonso and S. F. Aliño¹

Department of General and Digestive Surgery. Hospital Clínico Universitario. Departments of Surgery and ¹Pharmacology. Universidad de Valencia. Valencia, Spain

ABSTRACT

Aim: to test the efficacy of anti-k-ras and antitelomerase oligonucleotides for disabling colorectal cancer cell growth.

Material and methods: an established human colorectal cancer cell line (SW 480, ATTC®) was used. Oligodeoxiribonucleotides (ODNs) have a phosphorotioate modification to ensure intracellular intake. We used an antitelomerase ODN (Telp5) and two anti-k-ras ODNs (AS-KRAS and ISIS). AS-KRAS is designed to join the k-ras oncogene's exon 1. ISIS links to the terminal transcription unit 5' of k-ras. Telp5 joins the template region of the hTR telomerase subunit. ODNs have been tested in different concentrations (1, 5, 10, 20 micromolar). Cell viability has been tested at 48 and 72 hours. Statistical analysis and graphic design were made with the statistical package "Analyzing Data with GraphPad Prism-1999", GraphPad Software Inc., San Diego CA®. We used the Student's t test for statistical analysis.

Results: the lowest dose (1 µM) was not effective. Using the highest dose (20 µM for 48 hours) of combined AS-KRAS and Telp5 cell viability decreased to 99.67%. The rest of results varied depending on ODN type, dose, and exposure time.

Conclusions: tested antisense ODNs stop colorectal cancer cell growth, and a combination of anti-telomerase and anti-k-ras is the most useful treatment. Efficacy is best with a higher dose and longer treatment period.

Key words: Colorectal cancer. Oligoribonucleotides. K-ras oncogene. Telomerase. Antisense therapy.

Lledó S, Alfonso R, Aliño SF. Antisense gene therapy using anti-k-ras and antitelomerase oligonucleotides in colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 472-480.

Recibido: 13-09-04.
Aceptado: 04-01-05.

Correspondencia: Salvador Lledó Matoses. Servicio de Cirugía-5º C. Hospital Clínico Universitario. Avda. Blasco Ibáñez, 17. 46010 Valencia. e-mail: cirugia@telefonica.net

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) survival after curative surgery depends on local and distant recurrence. After curative resection 5-year survival varies from 40 to 80% depending on local recurrence rates (1). With a 100% control of local disease, 17% of patients will die from cancer; with a local control of 80%, 31% of deaths will occur (2). These recurrences may result from tumoral cell spread during surgery (3,4).

The K-ras oncogene is activated in almost 70% of human CRCs (5). This is partly responsible for the uncontrolled growth of CRC cells (6). Its activation is also related to vascular endothelial growth factor (VEGF) hyperexpression, which is involved in angiogenesis (7).

DNA in telomeres shortens with each cellular division. In normal cells DNA shortens with each DNA replication, and therefore chromosomes become unstable, and cells cannot divide and eventually die.

Nevertheless, more than 90% of cancer cells have increased telomerase activity, which contributes to tumor cell uncontrolled growth (8). Telomerase activity is increased in 90-100% of human CRCs (9,10). This fact has been proposed as an alternative tumor development pathway (11).

Antisense techniques for gene therapy consist in blocking the expression of a gene using an oligonucleotide that is complementary to the gene sequence whose blocking is desired (12). Such an antisense nucleotide can be chemically designed, the simplest way to do so being the generation of a small piece of DNA: an oligodeoxiribonucleotide. Antisense sequences are designed in such a way that they recognize and link specific mRNA sequences. In this way, the double-chain hybrids generated cannot be translated by the ribosome into a protein, and protein translation cannot take place.

In our study antisense oligodeoxiribonucleotides (AS-ODN) have been designed to interfere with K-ras and

telomerase (hTERT subunit) genes. The aim of this study was to evaluate growth inhibition achieved *in vitro* in an established CRC cell line.

MATERIAL AND METHODS

An established human cell line was used: SW 480 (ATCC. *The Global Bioresource Center*[®]). This cell line comes from primary colorectal adenocarcinomas in stage B of Dukes' classification. It has a mutation in codon 273 of the p53 gene and a mutation in codon 12 of the protooncogene k-ras.

Cell viability studies have been made with the commercial kit Calcein-AM (Molecular Probes[®]). This procedure allows to identify living cells after incubation with modified calcein. Calcein-AM has a fluorescent activity that develops only when metabolized by viable cells.

AS-ODNs used have a phosphorotioate modification in order to prevent degradation by cellular nucleases, so intracellular intake is ensured. We designed an antitelomerase AS-ODN (Telp5) and two anti k-ras AS-ODNs (AS-KRAS and ISIS). The sequences of each AS-ODN are: ISIS 6957: 5'-CAG TGC CTG CGC CGC GCT CG-3'; AS-KRAS: 5'-AAG TTT ATA TTC AGT CAT-3'; Telp5: 5'-CCC TTC TCA GTT AGG GTT AG-3'.

ISIS 6957 has been previously used by other groups (13,14). The AS-KRAS tested in our study was designed to link exon 1 of the k-ras oncogene. ISIS joins the 5' terminal transcription unit of the k-ras oncogene. Telp5 links the telomerase hTR subunit. AS-ODNs were tested in different concentrations: 1, 5, 10 and 20 µM. We selected these amounts based on studies by other groups (13,15,16), but taking into consideration that we used no transfection vectors to facilitate cellular intake. No cytotoxicity has been described *in vitro* with concentrations

under 100 mM, nor toxicity in murine or ape models using intravenous doses under 100 mg/kg (12).

For viability/cytotoxicity experiments we used 96 cell culture plates in which treatments were applied in triplicate (three times).

After 24 and 72 hours of incubation with the various AS-ODN treatment combinations the effect on cellular viability was studied. For that purpose we used the "LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit" from *Molecular Probes*[®]. This kit contains modified calcein (calcein-AM), a substance with silenced fluorescent calcein. When this substance penetrates viable cells, calcein is metabolized and recovers fluorescence, which is then measured in relative fluorescence units (RFU).

For the statistical analysis and graphic design we used the program "Analyzing Data with GraphPad Prism-1999", GraphPad Software Inc., San Diego CA[®]. After determining the fluorescence (RFU) emission with each dose (1, 5, 10 and 20 µM) applied for 48 and 72 hours, a Student's t test was used to compare them with the RFU control group. A $p < 0.05$ was considered statistically significant. Although the statistical analysis was made using RFUs, our results are shown as rates of viability with respect to the control group, which presents a 100% viability rate, in order to facilitate reader comprehension (Table I).

RESULTS

Viability test with calcein-AM characterization

In order to know the optimal conditions for our study's technique, SW-480 cells were incubated with calcein for different periods of time, and the different fluorescent emissions were registered with a microplate cytofluorometer. Results (Fig. 1) show that a maximum of cellular fluo-

Table I. Statistical analysis: comparison of control group viability (RFU) vs. viability (RFU) after AS-ODN treatment

Control vs. ODN-AS 48 hours treatment	T Student (p)	Sig	Control vs. ODN-AS 72 hours treatment	T Student (p)	Sig
AS-KRAS 1 µM	0.0136	**	AS-KRAS 1 µM	1	NS
AS-KRAS 5 µM	0.005	**	AS-KRAS 5 µM	0.0002	***
AS-KRAS 10 µM	0.0005	***	AS-KRAS 10 µM	0.0002	***
AS-KRAS 20 µM	0.0003	***	-		
Telp5 1 µM	1	NS	Telp5 1 µM	1	NS
Telp5 5 µM	1	NS	Telp5 5 µM	0.0002	***
Telp5 10 µM	0.29	NS	Telp5 10 µM	0.0002	***
Telp5 20 µM	0.0007	***	-		
Anti K-T 1 µM	1	NS	Anti K-T 1 µM	1	NS
Anti K-T 5 µM	0.0006	***	Anti K-T 5 µM	0.0001	***
Anti K-T 10 µM	0.0004	***	Anti K-T 10 µM	< 0.0001	***
Anti K-T 20 µM	0.0001	***	-		
ISIS 1 µM	0.0513	NS	ISIS 1 µM	1	NS
ISIS 5 µM	0.0077	**	ISIS 5 µM	1	NS
ISIS 10 µM	0.0136	**	ISIS 10 µM	0.0011	**
ISIS 20 µM	0.0029	**	-		

Telp5 = antitelomerase; Anti K-T = AS-KRAS + Telp5; Sig = statistical significance; NS = no statistical significance. $p < 0.005 = *$; $p < 0.02 = **$; $p < 0.001 = ***$

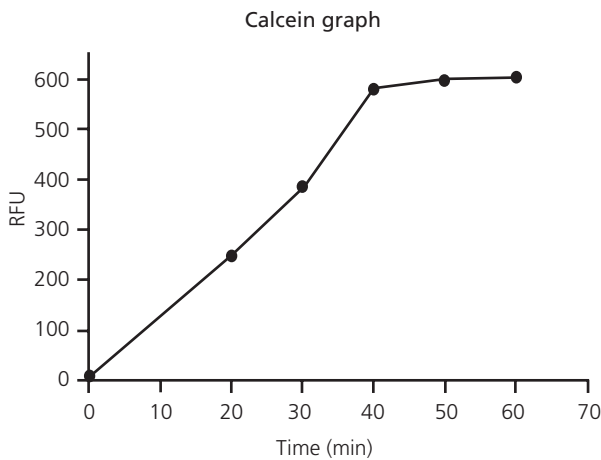


Fig. 1.- Calcein graph. After administration calcein enters the cell, and fluorescence will only be obtained in viable cells. The curve becomes stable at 40 minutes, so measurement data for calcein cellular intake were obtained from this time on. RFU: Relative fluorescence units. *Curva de calceína. Tras administrar la calceína, esta penetra en el interior celular, y sólo en aquellas células viables se emitirá fluorescencia. Se observa cómo dicha curva entra en meseta a los 40 minutos, por lo que la lectura de su actividad se ha realizado a partir de este tiempo. UFR: unidades de fluorescencia relativa.*

rescence is reached after 40 minutes of incubation, so these were the conditions maintained for further studies.

Cell viability after 48 hours of treatment with AS-ODN

In figure 2 we show viability after 48 hours of treatment with AS-ODN depending on concentration:

1. 20 µM concentration treatment:
 - AS-KRAS decreases cell viability by 41%.
 - Telp5 decreases cell viability by 26%.
 - Combined AS-KRAS and Telp5 decrease cell viability by 99.6%.
 - ISIS decreases cell viability by 14.52%.
2. 10 µM concentration treatment:
 - AS-KRAS decreases cell viability by 32.3%
 - Telp5 decreases cell viability by 0.6%.
 - Combined AS-KRAS and Telp5 decrease cell viability by 34.65%.
 - ISIS decreases cell viability by 6%.
3. 5 µM concentration treatment:
 - AS-KRAS decreases cell viability by 32%.
 - Telp5 decreases cell viability by 0%.
 - Combined AS-KRAS and Telp5 decrease cell viability by 30%.
 - ISIS decreases cell viability by 8%.
4. 1 µM concentration did not affect cell viability.

The effect of AS-ODN treatment at peak concentration for 48 hours is shown in figure 3.

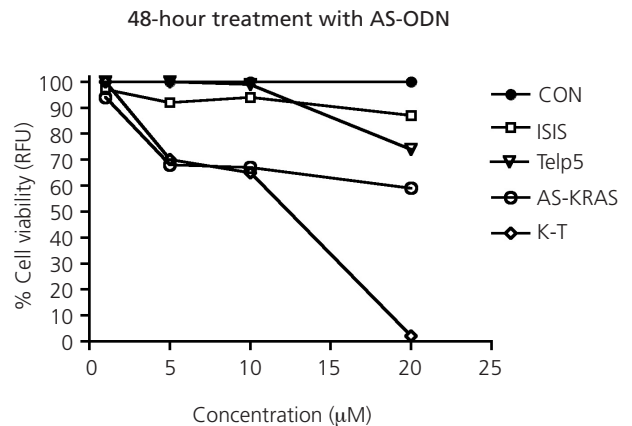


Fig. 2.- Effects of 48-hour treatment with AS-ODNs on cell viability. Viability is expressed as relative fluorescence units (RFU). The combination of anti-k-ras and antitelomerase at 20 µM concentrations produced a fluorescence emission lower than 1% (p = 0.0001). CON = control group, cells without treatment; Telp5 = antitelomerase; AS-KRAS = anti-K-ras; K-T = combination of anti-K-ras and antitelomerase; ISIS = anti-k-ras Isis 6957.

Efectos de la aplicación durante 48 horas de ODN-AS sobre la viabilidad celular en función de las concentraciones empleadas. La viabilidad se expresa en unidades de fluorescencia relativa (UFR). La combinación de tratamientos anti K-ras y antitelomerasa en concentraciones 20 µM, se asocia a una emisión de fluorescencia inferior al 1% (p = 0.0001). CON = control, sin tratamiento; Telp5 = anti-telomerasa; AS-KRAS = anti K-ras y K-T = tratamiento combinado (anti K-ras y antitelomerasa); ISIS= anti k-ras Isis 6957.

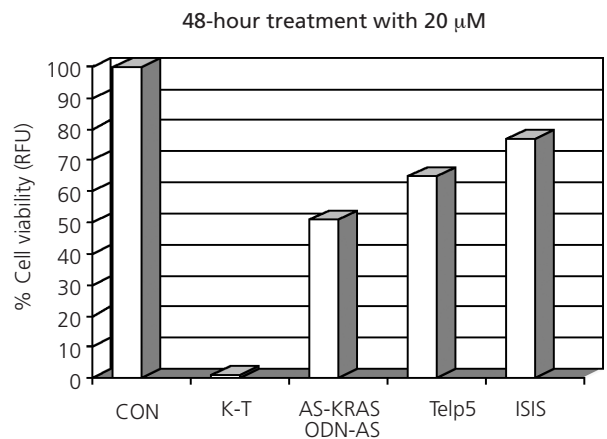


Fig. 3.- 48-hour treatment with the highest concentration of AS-ODN. Cells without treatment (control group; CON) show 100% viability. Combining anti-k-ras and antitelomerase, ODN viability is decreased to < 1%.

Efecto de los ODN-AS con la máxima concentración aplicada durante 48 horas. Las células sin tratamiento o grupo control (CON), presentan 100% de viabilidad. Con el tratamiento combinado anti K-ras y antitelomerasa, la viabilidad celular se reduce a menos de 1%.

Cell viability after 72 hours of treatment with AS-ODN

In figure 4 we show how cell viability decreases after 72 hours of treatment with AS-ODN:

1. *10 µM concentration treatment:*

—AS-KRAS decreases cell viability by 56%.

—Telp5 decreases cell viability by 4%.

—Combined AS-KRAS and Telp5 decrease cell viability by 99.8%.

—ISIS decreases cell viability by 28.5%.

2. *5 µM concentration treatment:*

—AS-KRAS decreases cell viability by 55.57%.

—Telp5 decreases cell viability by 54.68%.

—Combined AS-KRAS and Telp5 decrease cell viability by 63.07%.

—ISIS did not affect cell viability.

3. *1 µM concentrations did not affect cell viability.*

Combined treatment with AS-KRAS and Telp5 caused a 100% mortality of tumoral cells.

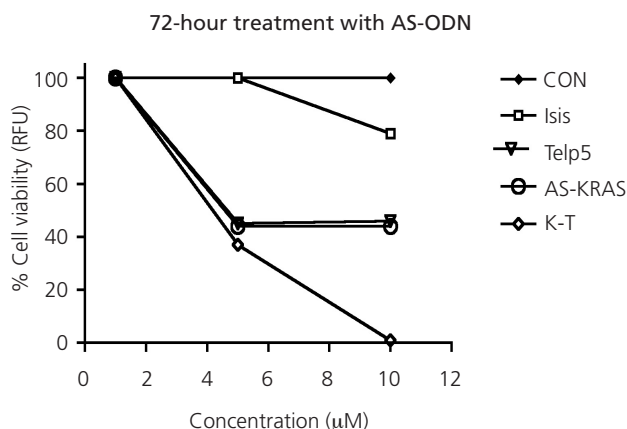


Fig. 4.- Effects of 72-hour treatment with AS-ODNs on cell viability. Viability is expressed as relative fluorescence units (RFU). The combination of anti-k-ras and antitelomerase at 10 µM concentrations produces a fluorescence emission lower than 1% ($p < 0.0001$). The 1 µM dose had no statistical significance ($p < 0.05$) for any applied treatment. CON = control group; cells without treatment; Telp5 = antitelomerase; AS-KRAS = anti-K-ras; K-T = combination of anti-K-ras and antitelomerase; ISIS= anti-k-ras Isis 6957.

Efectos de la aplicación durante 72 horas de ODN-AS sobre la viabilidad celular en función de las concentraciones empleadas. La viabilidad se expresa en unidades de fluorescencia relativa (UFR). La combinación de tratamientos anti K-ras y antitelomerasa en concentraciones 10 µM, se asocia a una emisión de fluorescencia inferior al 1% ($p < 0,0001$). La dosis 1 µM no fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para ningún tratamiento aplicado. CON = control, sin tratamiento; Telp5 = antitelomerasa; AS-KRAS = anti K-ras y K-T = tratamiento combinado (anti K-ras y antitelomerasa); ISIS= anti k-ras Isis 6957.

DISCUSSION

In our study we tested the effect on cell viability of antisense therapy with oligodeoxiribonucleotides blocking

the k-ras oncogene and telomerase gene in a human colorectal cancer line (SW480). Our results show that independent treatment with each AS-ODN can exert partially inhibiting effects (approximately 50%) on cell proliferation. Nevertheless, a combination of anti-k-ras and antitelomerase has a remarkable synergy that leads to a complete loss of tumoral cell viability ($> 99.5\%$).

In vitro cytotoxicity tests are of great importance in the development of new biological agents with cytotoxic activity, especially if those procedures are of high sensitivity and avoid the use of conventional nuclide (usually Cr^{51}) protocols. In our study we used a cytotoxicity test based on microplate cytofluorometry. It is based on fluorochrome calcein with chemically concealed fluorescence. After active cellular metabolization fluorescence is recovered, and this metabolization can only be done by viable cells.

Cytotoxicity studies with fluorometry show that all AS-ODNs tested achieved significant reductions in cell viability. Nevertheless, relevant differences in efficacy showed up. Of the two AS-ODNs tested against the k-ras oncogene, ISIS (designed to link mRNA's 5' terminal end of k-ras) showed a 30% inhibiting effect on cell viability. In equal conditions, AS-KRAS (designed to bind exon 1 of k-ras oncogene) had a higher inhibiting activity (55%). In both cases the maximum effect seems to have been reached, because after 72 hours of treatment period with 5 µM ODN concentrations viability does not decrease with higher concentrations. If we compare our results with those from other groups, a 20% viability reduction has been described by blocking k-ras with a cationic lipid leaded ODN after a 48-hour treatment period (17). Guan Chen's team achieved 70% of cell proliferation inhibition after 72 hours of treatment with anti k-ras ODN (14). In this same study ISIS 6957 was tested, and it only yielded 26% of inhibition in cellular growth with 400 nM after 72 hours of treatment. In their experiment they used a human lung fibroblast model and bladder cancer cells, so results are only partially comparable to ours, as we used another cell type for the tests.

Cell viability results with our antitelomerase ODN were similar in power and efficacy to those obtained with our anti-k-ras ODNs. Both 5 and 10 µM concentrations produced decreased viability in similar rates, which suggests that these doses are most specifically effective for Telp5.

Other studies (18-21) proved the possibility of blocking the telomerase gene with a phosphorotioate ODN. Herbert (22) demonstrated a 50% viability inhibition with 1 nanomolar lipid-vehiculized treatment, and also a viability reduction with non-lipid-vehiculized micromolar concentrations. In Herbert's experiment their antitelomerase ODN also binds the telomerase hTR subunit, but results are not comparable to ours for cultures were of breast cancer epithelial cells. Elayadi et al. (23) described telomerase gene blockade with a phosphorotioate ODN in a Jurkat T lymphocyte (leukemia) cell line. After 36 hours of treatment with 0.25 µM cellular

activity decreased in 27%. A 2 μ M dose decreased viability by 65%. ODNs were lipid-vehiculized with lipoplectamine. Recently, Wong et al. (24) published their results using ODNs that link the telomerase hTR subunit in CRC, and they obtained varied results on viability reduction depending on the type of cell line tested (12-37%).

Our results in antisense gene therapy point out that AS-ODNs designed by our group are some of the most powerful ever described. Moreover, AS-KRAS acts earlier in time than Telp5. An explanation for this could be the different metabolic pathways followed by each AS-ODN. Nevertheless, what is of great relevance is the fact that our combined anti-k-ras and antitelomerase treatment has a synergic effect that leads to an inhibition of cell viability reaching > 99.5%. This opens an attractive alternative pathway in antisense therapy, specially considering that those results may be improved using transfection vectors. This, together with the improvement of cell transfection with AS-ODN (with a subsequent reduction in therapeutical dose) suggests the ability to simultaneously introduce combinations of AS-ODNs in cancer cells. Moreover, our results have been expressed as cell viability reduction rates. This is a good approximation to explain antisense therapy effects, but it would be desirable to quantify telomerase and k-ras expression, as well as treatment-derived proteins in further studies.

In summary, gene therapy with antisense oligonucleotides has been shown to be effective in our experience, especially the combination of anti k-ras and antitelomerase treatment, both implicated in CRC cell viability. *In vivo* applicability, usefulness and secondary effects need to be further established. Further studies will be needed to evaluate the *in vivo* efficacy of these AS-ODNs and their combinations using transfection vectors for the improvement of clinical applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was completely supported by an "Investigation Grant by the Spanish Gastroenterology Foundation". The authors want to thank this foundation for their support.

REFERENCES

- Hermanek P, Wiebelt H, Stammer D, Riedl S. Prognostic factors of rectum carcinoma. Experience of the German Multicentre Study SGCRC. German Study Group Colo-Rectal Carcinoma. *Tumori* 1995; 81 (Supl. 3): 60-4.
- Hermanek P. Impact of surgeon's technique on outcome after treatment of rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1999; 42 (5): 559-62.
- Umpleby HC, Fermor B, Symes MO, Williamson RC. Viability of exfoliated colorectal carcinoma cells. *Br J Surg* 1984; 71 (9): 659-63.
- Solomon MJ, Egan M, Roberts RA, Philips J, Russell P. Incidence of free colorectal cancer cells on the peritoneal surface. *Dis Colon Rectum* 1997; 40 (11): 1294-8.
- Ward RL, Todd AV, Santiago F, O'Connor T, Hawkins NJ. Activation of the K-ras oncogene in colorectal neoplasms is associated with decreased apoptosis. *Cancer* 1997; 79 (6): 1106-13.
- Sakakura C, Hagiwara A, Tsujimoto H, Ozaki K, Sakakibara T, Oyama T, et al. Inhibition of colon cancer cell proliferation by antisense oligonucleotides targeting the messenger ARN of the Ki-ras gene. *Anticancer Drugs* 1995; 6 (4): 553-61.
- Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L, et al. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (7): 3609-14.
- Dasí F, Marugán M, Lledó S, Cervantes A, García-Granero E, García-Conde J, et al. Telomerasa: biología e implicaciones clínicas. *Hematol Citocinas Immunoter Ter Cel* 2002; 5 (2): 121-35.
- Yoshida K, Sugino T, Goodison S, Warren BF, Nolan D, Wadsworth S, et al. Detection of telomerase activity in exfoliated cancer cells in colonic luminal washings and its related clinical implications. *Br J Cancer* 1997; 75 (4): 548-53.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266 (5193): 2011-5.
- Brown T, Aldous W, Lance R, Blaser J, Baker T, Williard W. The association between telomerase, p53, and clinical staging in colorectal cancer. *Am J Surg* 1998; 175 (5): 364-6.
- Mercola D, Cohen JS. Antisense approaches to cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 1995; 2 (1): 47-59.
- Andreyev HJN, Ross PJ, Cunningham D, Clarke PA. Antisense treatment directed against mutated ki-ras in human colorectal carcinoma. *Gut* 2001; 48 (2): 230-7.
- Chen G, Oh S, Monia BP, Stacey DW. Antisense oligonucleotides demonstrate a dominant role of c-ki-ras proteins in regulating the proliferation of diploid human fibroblasts. *J Biol Chem* 1996; 271 (45): 28259-65.
- Pang JX, Chen XY, Xu W, Wu SG. Antisense Sp1 oligodeoxynucleotide decreases telomerase activity by inhibiting hTERT mRNA expression in Jurkat T cells. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24 (1): 91-6.
- Pruzan R, Pongracz K, Gietzen K, Wallweber G, Gryaznov S. Allosteric inhibitors of telomerase: oligonucleotide N3'→P5'phosphoramidates. *Nucleic Acids Res* 2002; 30 (2): 559-68.
- Ross PJ, George M, Cunningham D, DiStefano F, Jervoise H, Andreyev H, et al. Inhibition of Kirsten-ras expression in human colorectal cancer using rationally selected kirsten-ras antisense oligonucleotides. *Mol Cancer Ther* 2001; 1 (1): 29-41.
- Pang JX, Chen XY, Wu SG. Regulation of telomerase activity in Jurkat T cells by transcription factors Sp1 and Sp3. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2002; 22 (6): 481-5.
- He DM, Zhang H. Telomerase gene antisense oligodeoxynucleotide down-regulates telomerase activity in HL-60 cells. *Ai Zheng* 2002; 21 (10): 1070-4.
- Wang X, Zhang Z, Xu Y, Chen S, Xiong W. Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis in lung cancer cell by human telomerase reverse transcriptase gene antisense oligodeoxynucleotide. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2002; 41 (3): 175-8.
- Xie W, Lin M. Study on induction of leukemic cell apoptosis by antisense oligodeoxynucleotide of human telomerase RNA. *Zhonghua Xue Ye Za Zhi* 2001; 22 (5): 245-8.
- Herbert BS, Pongracz K, Shay JW, Gryaznov SM, Shea-Herbert Brittney. Oligonucleotide N3'→P5'phosphoramidates as efficient telomerase inhibitors. *Oncogene* 2002; 21 (4): 638-42.
- Elayadi AN, Demieville A, Wancewicz EV, Monia BP, Corey DR. Inhibition of telomerase by 2'-O- (2-methoxyethyl) RNA oligomers: effect of length, phosphorothioate substitution and time inside cells. *Nucleic Acids Res* 2001; 29 (8): 1683-9.
- Wong SC, Yu H, Moochhalala SM, So JB. Antisense telomerase induced cell growth inhibition, cell cycle arrest and telomerase activity down-regulation in gastric and colon cancer cells. *Anticancer Res* 2003; 23 (1 A): 465-9.

Eficacia de la terapia génica antisentido utilizando oligonucleótidos anti K-ras y antitelomerasa en cáncer colorrectal

S. Lledó, R. Alfonso y S. F. Aliño¹

Servicio de Cirugía General y Digestiva. Hospital Clínico Universitario. Departamentos de Cirugía y ¹Farmacología. Universidad de Valencia. Valencia.

RESUMEN

Objetivo: evaluar la eficacia de oligonucleótidos anti k-ras y antitelomerasa para detener el crecimiento tumoral en el cáncer colorrectal.

Material y métodos: se ha empleado una línea celular establecida de cáncer colorrectal humano (SW 480, ATTC®). Los oligodesoxirribonucleótidos (ODN) utilizados en el presente trabajo presentan modificación fosforotioato con el fin de mejorar su estabilidad en presencia de fluidos biológicos. Hemos utilizado un ODN antitelomerasa (Telp5), y dos ODN anti k-ras (AS-KRAS e ISIS). AS-KRAS actúa en el exón 1 e ISIS actúa a nivel de la unidad terminal de transcripción 5' del oncogen k-ras. Telp5 se une a la subunidad hTR de la telomerasa. Se han aplicado en concentraciones 1, 5, 10 y 20 micromolar, midiendo la viabilidad celular a las 48 y 72 horas de tratamiento. El análisis estadístico y el diseño de los gráficos se han realizado mediante el programa "Analyzing Data with GraphPad Prism-1999". GraphPad Software Inc., San Diego CA®. Para el tratamiento estadístico se ha utilizado el test t de Student.

Resultados: la dosis mínima (1 µM) no fue efectiva ni a 48 ni a 72 horas postratamiento. Con la dosis máxima (20 µM durante 48 horas) y utilizando la combinación de AS-KRAS y Telp5 obtuvimos una reducción de la viabilidad celular del 99,67%. El resto de resultados fueron intermedios, dependiendo del tipo de oligonucleótido empleado, la dosis y el tiempo de exposición.

Conclusiones: los oligonucleótidos antisentido probados detienen el crecimiento celular en el cáncer colorrectal, siendo la respuesta más eficaz la combinación de ambos y aumentando dicha eficacia con mayor dosis y tiempo de exposición.

Palabras clave: Cáncer colorrectal. Oligonucleótidos. Oncogén k-ras. Telomerasa. Terapia antisentido.

INTRODUCCIÓN

La supervivencia del cáncer colorrectal (CCR) tras la cirugía considerada curativa está marcada por el desarrollo de recidivas locales y a distancia. En resecciones curativas la supervivencia a 5 años varía del 40 al 80% en función de la tasa de recidiva local (1). Con un control local de la enfermedad del 100% las muertes por cáncer serán de un 17%; con un control local del 80% ocurrirán un 31% de muertes (2). Estas recidivas pueden deberse a diseminación de células tumorales durante el proceso quirúrgico (3,4).

El oncogén K-ras se encuentra activado aproximadamente en el 70% de los cánceres colorrectales humanos

(5). Esto es responsable, en parte, del crecimiento incontrolado de las células de CCR (6). Asimismo, su activación se correlaciona con la sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), implicado en fenómenos angiogénicos (7).

El ADN telomérico se acorta con cada división celular. En las células normales, se van acortando con cada replicación del ADN, con lo cual los cromosomas se vuelven inestables, las células son incapaces de dividirse y mueren.

Sin embargo, más del 90% de las células cancerosas presentan una actividad telomerasa elevada, lo cual contribuye al crecimiento sin control de las células transformadas (8). La actividad telomerasa se encuentra aumentada en 90-100% de los cánceres colorrectales humanos (9,10). Este hecho se ha propuesto como una vía de desarrollo tumoral alternativa (11).

Las técnicas antisentido para terapia génica consisten en el bloqueo de la expresión de un gen utilizando un oligonucleótido complementario de la secuencia del gen que se desea bloquear (12). El nucleótido antisentido puede sintetizarse químicamente y la forma más simple es generar un pequeño fragmento de DNA, un oligodesoxirribonucleótido. Las secuencias antisentido se diseñan de forma que reconozcan e hibriden con secuencias específicas presentes en el ARNm, de manera que los híbridos de doble cadena generados no pueden ser traducidos por el ribosoma para generar la proteína correspondiente al ARNm y la traducción de la proteína no se llevará a cabo.

En el presente trabajo, los oligodesoxirribonucleótidos antisentido (ODN-AS) han sido diseñados para interferir sobre los genes humanos K-ras y telomerasa (subunidad hTERT). Nuestro propósito ha sido estudiar la inhibición del crecimiento que provocan en una línea celular de cáncer colorrectal *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos utilizado la línea celular humana: SW 480 (ATCC. The Global Bioresource Center®) la cual proviene de pacientes con adenocarcinomas colorrectales pri-

marios en estadio B de Dukes. Presenta mutación en el codón 273 del p53 y una mutación en el codón 12 del protooncogén K-ras.

Los estudios de viabilidad celular han sido llevados a cabo utilizando el kit comercial Calceína-AM (*Molecular Probes*). Este procedimiento permite la identificación de las células vivas cuando estas son incubadas en presencia de la calceína modificada. Esto es debido a que la calceína-AM que tiene apantallada su capacidad fluorescente, puede ser recuperada tras su metabolización intracelular, lo cual sólo puede suceder cuando las células están vivas.

Los ODN-AS empleados presentan modificación fosforotioato con el fin de reducir la degradación por las endonucleasas celulares y asegurar su entrada nuclear. Hemos utilizado un ODN-AS antitelomerasa (Telp5) y dos ODN-AS anti k-ras (AS-KRAS e ISIS). Las secuencias de cada oligonucleótido son: ISIS 6957: 5'-CAG TGC CTG CGC CGC GCT CG-3'; AS-KRAS: 5'-AAG TTT ATA TTC AGT CAT-3'; Telp5: 5'-CCC TTC TCA GTT AGG GTT AG-3'.

ISIS 6957 ha sido utilizado previamente por otros grupos (13,14). El AS-KRAS utilizado en el presente estudio, está diseñado contra el exón 1 del oncogén k-ras, mientras que ISIS actúa sobre la unidad terminal de transcripción 5'. El ODN-AS Telp5 actúa sobre el RNA de la subunidad hTR de la telomerasa humana. Los oligonucleótidos fueron utilizados en concentraciones de 1, 5, 10 y 20 μM . La elección de estas dosis se ha basado en las utilizadas por otros grupos (13,15,16), pero tomando en consideración que en nuestros experimentos no se utilizan vectores de transferencia para facilitar el acceso de los ODN-AS a la célula. No se ha descrito citotoxicidad *in vitro* a concentraciones inferiores a 100 mM, ni tampoco toxicidad subaguda significativa en roedores y monos tras dosis intravenosas de hasta 100 mg/kg (12).

Los estudios de viabilidad/toxicidad celular se han realizado utilizando células cultivadas en placas de 96 pocillos, los cuales fueron sometidos a diferentes tratamientos, por triplicado.

Tras un periodo de 24 a 72 horas de incubación con los diferentes ODN-AS, estudiamos el efecto conseguido sobre la viabilidad celular. Hemos utilizado el kit "LIVE/DEAD viabilidad/citotoxicidad" de *Molecular Probes*®. El kit contiene calceína modificada (calceína-AM), una sustancia que tiene apantallada la capacidad fluorescente de la calceína y que al penetrar en las células vivas, esta es metabolizada y recupera su capacidad de emitir fluorescencia, la cual se mide en unidades de fluorescencia relativa (UFR).

Para los análisis estadísticos y el diseño de gráficos se ha utilizado el programa "Analyzing Data with GraphPad Prism-1999". *GraphPad Software Inc.*, San Diego CA®. Determinada la fluorescencia emitida (UFR) con cada dosis (1, 5, 10 y 20 μM) aplicada durante 48 y 72 horas, se realizó el test de Student comparándolas con las UFR del grupo control. Se asumió una $p < 0,05$ para establecer diferencias estadísticamente

significativas. Si bien el análisis estadístico se ha realizado utilizando las UFR, los resultados se muestran como porcentaje de viabilidad respecto al grupo control, al que se le supone el 100% de viabilidad, para una mejor comprensión del resultado (Tabla I).

RESULTADOS

Caracterización del test de viabilidad celular con calceína-AM

Con el fin de conocer las condiciones óptimas de la técnica en nuestro estudio, las células SW-480 fueron incubadas con calceína durante periodos variables de tiempo y la fluorescencia medida en un citofluorímetro de microplacas. Los resultados (Fig. 1) ponen de manifiesto que el máximo de fluorescencia celular se alcanza a los 40 min de la incubación y por ello, estas condiciones fueron mantenidas en todos los estudios posteriores.

Viabilidad celular a las 48 horas del tratamiento con ODN-AS

En la figura 2, quedan representados los efectos a las 48 horas de la aplicación de ODN-AS sobre viabilidad celular en función de las concentraciones:

1. Tratamiento con una concentración 20 μM :

—Con el ODN-AS AS-KRAS la viabilidad celular se reduce un 41%.

—Con el ODN-AS Telp5 la viabilidad se reduce un 26%.

—Con la combinación de ambos la viabilidad se reduce un 99,6%.

—Con el ODN-AS ISIS la viabilidad se reduce un 14,52%.

2. Tratamiento con una concentración 10 μM :

—Con ODN-AS AS-KRAS la viabilidad celular se reduce un 32,3%.

—Con ODN-AS Telp5 la viabilidad se reduce un 0,6%.

—Con la combinación de ambos (K-T) la viabilidad se reduce un 34,65%.

—Con el ODN-AS ISIS la viabilidad se reduce en un 6%.

3. Tratamiento con una concentración 5 μM :

—Con ODN-AS AS-KRAS la viabilidad celular se reduce un 32%.

—Con ODN-AS Telp5 la viabilidad celular se reduce un 0%.

—Con la combinación de ambos (K-T) la viabilidad se redujo un 30%.

—Con el ODN-AS ISIS la viabilidad se redujo un 8%.

4. Con una concentración 1 μM la viabilidad no se vio afectada.

La figura 3 ilustra el efecto de los ODN-AS con la máxima concentración aplicada durante 48 horas.

Tabla I. Análisis estadístico: comparación de la viabilidad (UFR) del grupo control vs. viabilidad (UFR) tras aplicación de ODN-AS

Control vs. ODN-AS 48 horas	T de Student (p)	Sig	Control vs. ODN-AS 72 horas	t de Student (p)	Sig
AS-KRAS 1 µM	0,0136	**	AS-KRAS 1 µM	1	NS
AS-KRAS 5 µM	0,005	**	AS-KRAS 5 µM	0,0002	***
AS-KRAS 10 µM	0,0005	***	AS-KRAS 10 µM	0,0002	***
AS-KRAS 20 µM	0,0003	***	—	—	—
Telp5 1 µM	1	NS	Telp5 1 µM	1	NS
Telp5 5 µM	1	NS	Telp5 5 µM	0,0002	***
Telp5 10 µM	0,29	NS	Telp5 10 µM	0,0002	***
Telp5 20 µM	0,0007	***	—	—	—
Anti K-T 1 µM	1	NS	Anti K-T 1 µM	1	NS
Anti K-T 5 µM	0,0006	***	Anti K-T 5 µM	0,0001	***
Anti K-T 10 µM	0,0004	***	Anti K-T 10 µM	< 0,0001	***
Anti K-T 20 µM	0,0001	***	—	—	—
ISIS 1 µM	0,0513	NS	ISIS 1 µM	1	NS
ISIS 5 µM	0,0077	**	ISIS 5 µM	1	NS
ISIS 10 µM	0,0136	**	ISIS 10 µM	0,0011	**
ISIS 20 µM	0,0029	**	—	—	—

Telp5 = antitelomerasa; Anti K-T = AS-KRAS + Telp5; Sig = significación estadística; NS = no significativo estadísticamente; p < 0,005 = *; p < 0,02 = **; p < 0,001 = ***

Viabilidad celular a las 72 horas del tratamiento con ODN-AS

En la figura 4 queda representada la disminución de la viabilidad celular aplicando los ODN-AS durante 72 horas:

1. Tratamiento con una concentración 10 µM:

—Con ODN-AS AS-KRAS la viabilidad celular se redujo un 56%.

—Con ODN-AS Telp5 la viabilidad celular se redujo un 54%.

—Con la combinación de los dos (K-T) la viabilidad se redujo un 99,8%.

—Con el ODN-AS ISIS la viabilidad se redujo un 28,5%.

2. Tratamiento con una concentración 5 µM:

—Con ODN-AS AS-KRAS la viabilidad se redujo un 55,57%.

—Con ODN-AS Telp5 la viabilidad se redujo un 54,68%.

—Con la combinación K-T la viabilidad disminuyó un 63,07%.

—Con ODN-AS ISIS la viabilidad no disminuyó.

3. Con una concentración 1 µM no se obtuvo reducción de la viabilidad.

El tratamiento combinado con los oligonucleótidos antisentido AS-KRAS y anti-telomerasa Telp5, provoca una mortalidad prácticamente del 100% de las células tumorales.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la terapia con oligonucleótidos antisentido contra el oncogén K-ras y el gen de la telomerasa, sobre la viabilidad

de una línea celular humana (SW480), derivada de un adenocarcinoma de colon. Los resultados ponen de manifiesto que el tratamiento independiente con cada uno de los ODN-AS es capaz de ejercer efectos inhibidores parciales (50%, aproximadamente) sobre la proliferación celular. Sin embargo, el tratamiento conjunto con ODNs contra K-ras y telomerasa ejercen una importante sinergia que conduce a la pérdida completa de la viabilidad (> 99,5%) de las células tumorales.

Los estudios de citotoxicidad *in vitro*, tienen gran importancia en el desarrollo de nuevos agentes biológicos con actividad citotóxica, preferentemente si los procedimientos tienen elevada sensibilidad y evitan la utilización de los protocolos convencionales basados en la liberación de isótopos radiactivos (comúnmente ⁵¹Cr), previamente incorporados a las células. En el presente trabajo hemos utilizado un test de citotoxicidad por fluorimetría en microplacas, basado en la utilización del fluorocromo calceína, cuya fluorescencia ha sido apantallada mediante la modificación química de la molécula y cuya capacidad fluorescente puede ser recuperada por metabolización activa intracelular, lo cual sólo puede ser llevado a cabo en las células vivas.

Los estudios de citotoxicidad mediante fluorimetría indican que todos los ODN-AS utilizados ejercen significativas reducciones de la viabilidad celular. No obstante, existen diferencias relevantes en cuanto a su eficacia. En relación con los ODN-AS dirigidos contra el oncogén K-ras, debemos señalar que el ISIS, diseñado para actuar sobre el extremo 5'-terminal del RNAm, mostró efectos inhibidores del 30% sobre la viabilidad celular y en las mismas condiciones, el ODN-AS diseñado por nuestro grupo para actuar sobre el exón-1 (AS-KRAS), mostró una actividad inhibidora superior (55%). En ambos casos, el efecto observado parece ser máximo, ya que se alcanza incubando las células durante 72 h con concentra-

ciones 5 μM ODN y no aumenta con concentraciones superiores. Si comparamos los resultados obtenidos con los de otros grupos, se ha descrito reducción de la viabilidad en un 20% bloqueando k-ras mediante ODNs vehiculizados por lípido catiónico a las 48 horas (17). El estudio de Guan Chen y cols. (14), informa de una inhibición de la proliferación celular del 70% tras 72 horas de tratamiento con ODN anti k-ras. En este mismo estudio se utilizó el ISIS 6957, que produjo una inhibición del crecimiento de sólo el 26% con 400 nM tras 72 h de tratamiento. Este estudio utilizó como diana fibroblastos de pulmón humano, y células de cáncer vesical, por lo que los resultados no son totalmente comparables con los nuestros al ser diferente el tipo celular.

Los efectos sobre la viabilidad celular de los ODN-AS frente a la telomerasa pone de manifiesto que estos fueron similares en potencia y eficacia al ODN anti K-ras diseñado en nuestro laboratorio y de igual modo, las dosis de 5 y 10 μM mostraron similares efectos inhibidores sobre la viabilidad, sugiriendo que estas dosis deben representar la eficacia máxima específica del ODN antisentido.

Otros estudios (18-21) demuestran la posibilidad de bloquear la telomerasa, con ODN fosforotioato. El estudio de Herbert (22) demostró inhibición de la actividad telomerasa al 50% con dosis 1 nanomolar vehiculizada por lípidos, o concentraciones micromolar sin lípido. Este estudio actúa también contra la subunidad hTR, pero de nuevo los resultados no son comparables por tratarse de células epiteliales de mama. En el trabajo publicado por Elayadi y cols. (23), se describe tratamiento con ODN fosforotioato antitelomerasa en una línea de linfocitos T tipo Jurkat (leucemia). Tras 36 horas de tratamiento a concentración 0,25 mM la actividad celular decreció en 27%. Con 2 mM la reducción fue del 65%. El tratamiento se realizó en presencia de una sustancia lipídica (lipofectamina). Recientemente, el grupo de Wong (24), ha utilizado ODNs contra la subunidad hTR aplicados a CCR, obteniéndose resultados variados en función del tipo de línea celular utilizada (12-37%).

Los resultados derivados de los estudios con los ODN antisentido frente al oncogén K-ras y telomerasa indican que los ODN-AS diseñados por nosotros se encuadran

entre los de mayor eficacia descritos en la literatura. Además, el ODN AS-KRAS actúa antes en el tiempo que el Telp5, lo cual podría explicarse por las diferentes vías de actuación de cada uno. Sin embargo, la observación más relevante es que la administración conjunta de ambos tipos de ODN-AS genera un efecto sinérgico muy manifiesto que conduce a una inhibición completa (> 99,5%) de la viabilidad celular, lo cual abre una vía muy sugerente en el desarrollo de nuevas estrategias de terapia antisentido, sobre todo considerando que los éxitos alcanzados podrían ser mejorados utilizando vectores de transferencia y por tanto, junto con las ventajas de la mejora de la eficacia de la transferencia celular de los ODN y la reducción de las dosis necesarias para alcanzar el efecto terapéutico, se suma la ventaja de poder entregar de forma simultánea una mezcla de diferentes ODN a la misma célula. Por otro lado, nuestros resultados se han expresado en función de la capacidad de los ODN-AS para inhibir la viabilidad celular, lo cual es una buena aproximación al efecto de la terapia antisentido, pero sería interesante en próximos experimentos cuantificar la expresión de telomerasa y k-ras así como de sus proteínas derivadas tras el tratamiento.

En resumen, la terapia génica utilizando oligonucleótidos antisentido ha demostrado ser eficaz en nuestra experiencia, principalmente gracias a la sinergia observada con el tratamiento combinado, lo cual debe inhibir los mecanismos de expresión de los dos genes estudiados (K-ras y telomerasa), ambos implicados en la inhibición de la viabilidad celular del CCR. Queda por determinar la aplicabilidad, uso y efectos secundarios en modelos *in vivo*. Serán necesarios estudios futuros para evaluar la eficacia terapéutica de estos ODN-AS y/o su combinación utilizando vectores de transferencia, así como esclarecer su potencial utilidad clínica.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado en su totalidad mediante la Beca Ayuda a la Investigación de la Fundación Española de Patología Digestiva. Los autores agradecen a la Fundación su apoyo.