

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 007**

51 Int. Cl.:
C12N 15/67 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02731264 .4**
 96 Fecha de presentación: **05.04.2002**
 97 Número de publicación de la solicitud: **1390075**
 97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

54 Título: **Inducción por agentes quimioterapéuticos de la actividad del promotor Egr-1 en la terapia génica**

30 Prioridad:
06.04.2001 US 282040 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.05.2012

73 Titular/es:
**THE UNIVERSITY OF CHICAGO
5640 SOUTH ELLIS AVENUE, SUITE 405
CHICAGO, IL 60637, US y
DANA-FARBER CANCER INSTITUTE**

72 Inventor/es:
WEICHSELBAUM, Ralph, R.;
KUFE, Donald, W.;
GUPTA, Vinay;
MAUCERI, Helen;
PARK, James y
POSNER, Mitchell

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 380 007 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inducción por agentes quimioterapéuticos de la actividad del promotor Egr-1 en la terapia génica

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0001] La presente solicitud reivindica prioridad respecto a la solicitud de patente de los EE. UU. pendiente de tramitación con el número de serie 60/282.040, presentada el 6 de abril de 2001.

10 **1. Campo de la invención**

[0002] La presente invención se refiere en general a los campos de la biología molecular y la terapia del cáncer. Más en particular, se refiere al uso de compuestos químicos que dañan el ADN para inducir la expresión del promotor Egr-1. Esto permite una expresión específica del tejido de genes terapéuticos, los cuales, en combinación con los compuestos químicos que dañan el ADN, proporcionan una terapia para los pacientes que padecen cáncer.

2. Descripción de la técnica relacionada

[0003] Algunos procedimientos de tratamiento del cáncer, como la radioterapia y la quimioterapia, implican la producción de daños en el ADN de la célula cancerosa. La respuesta celular a los daños normales en el ADN incluye la activación de la reparación del ADN, la parada del ciclo celular y la letalidad (Hall, 1988). Por ejemplo, la inducción de roturas bicatenarias en el ADN resulta en aberraciones cromosómicas letales que incluyen deleciones, dicéntricos, anillos y puentes anafásicos (Hall, 1994).

[0004] Otra estrategia para el tratamiento del cáncer es la terapia génica. Esta implica la transferencia de un gen extraño a una célula cancerosa, a menudo un supresor tumoral o un inductor de apoptosis, en condiciones adecuadas para la expresión del gen. Una vez expresado, el producto génico confiere un efecto beneficioso en la célula tumoral por medio de la ralentización de su crecimiento, la inhibición de su potencial metastásico o su destrucción total.

[0005] La combinación de uno o más de estos procedimientos es una herramienta poderosa ya que la heterogeneidad en muchos tumores hace que las monoterapias sean mucho menos eficaces que las combinaciones. Sin embargo, tanto la radioterapia, como la quimioterapia y la terapia génica tienen potencial para producir efectos tóxicos. Por lo tanto, la posibilidad de reducir la toxicidad, por ejemplo, al reducir la cantidad de radiación, fármaco o vector administrados, es muy ventajosa.

[0006] Por ejemplo, se ha estudiado el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que tiene propiedades antitumorales, como un tratamiento sistémico de terapia génica para el cáncer en estudios de fase I, pero la toxicidad ha limitado el índice terapéutico de esta citocina (Spriggs y col., 1988; Demetri y col., 1989). También se han investigado combinaciones de TNF- α sistémico y quimioterapia en algunos ensayos clínicos con un éxito limitado (Nakamoto y col., 2000).

[0007] Por otro lado, los agentes quimioterapéuticos como cisplatino y otros análogos de platino se emplean actualmente en el tratamiento de varios cánceres, como los cánceres de cabeza y cuello, esofágico, de pulmón, testículos, ovarios y vejiga. Adicionalmente, el cisplatino se usa conjuntamente con irradiación (IR) como radiosensibilizante. A pesar de la relativa eficacia del cisplatino, la resistencia tumoral ha limitado el papel del cisplatino en la quimioterapia curativa del cáncer (Johnson y Stevenson, 2001). Los mecanismos de resistencia al cisplatino derivados del tumor incluyen un aumento de la reparación del ADN de los aductos de cisplatino en las células tumorales, un aumento de glutatión que inhibe la formación de radicales libres y los daños subsiguientes en el ADN y una relativa disminución de la absorción de cisplatino por las células resistentes (Kartalou y Essigmann, 2001). La combinación de cisplatino con otros agentes quimioterapéuticos, especialmente 5-FU y VP-16, ha aumentado el índice terapéutico de los dos agentes en algunos tumores humanos (Kucuk y col., 2000), pero se necesitan otras estrategias para aumentar la eficacia del cisplatino.

[0008] Por lo tanto, en la técnica hay necesidad de mejorar tanto los regímenes de tratamiento de terapia génica como los de tratamiento quimioterapéutico. Se desean terapias que combinen los beneficios de diferentes regímenes de tratamiento y a la vez reduzcan los efectos secundarios asociados.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0009] La presente invención supera las deficiencias en la técnica y proporciona usos que mejoran la utilidad terapéutica de la terapia génica así como de la quimioterapia. Se ha desarrollado una estrategia de direccionamiento transcripcional, en la que vectores de expresión inducibles que codifican genes terapéuticos son inducidos por agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos se dirigen específicamente a promotores inducibles del vector de expresión para proporcionar una terapia dirigida. Los usos terapéuticos proporcionados son especialmente eficaces en el tratamiento de tumores.

10 **[0010]** Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un vector de expresión en combinación con al menos un compuesto inductor radical libre que daña el ADN para uso en una terapia de acuerdo con la reivindicación 1.

[0011] La célula puede ser una célula cancerosa, por ejemplo, una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer testicular, una célula de cáncer de cerebro, una célula de cáncer de piel, una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer gástrico, una célula de cáncer de esófago, una célula de cáncer de tráquea, una célula de cáncer de cabeza y cuello, una célula de cáncer de páncreas, una célula de cáncer de hígado, una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer linfático, una célula de leucemia, una célula de cáncer de cérvix o una célula de cáncer de vulva.

20 **[0012]** El vector de expresión puede comprender además un origen de replicación, un marcador seleccionable o una señal de poliadenilación ligados operativamente al segmento de ácido nucleico. El vector de expresión puede ser un vector plasmídico o vírico, por ejemplo un vector de adenovirus, un vector del virus adenoasociado, un vector de retrovirus, un vector de lentivirus, un vector del virus de la vacuna o un vector del virus del herpes. El vector vírico puede carecer de uno o más genes víricos, lo que hace que el vector no pueda replicarse. La célula puede estar localizada en un organismo, por ejemplo un humano.

[0013] La proteína de interés puede ser un supresor tumoral, un inductor de apoptosis, una enzima, una toxina, una citocina o cualquier otra proteína con actividad antitumoral. Algunos ejemplos de supresores tumorales son Rb, p16, p53, PTEN, MDA7 o BRCA1 o BRCA2. Algunos ejemplos de inductores de apoptosis son Bax, Bad, Bik, AdE1B, Bim, Bcl-X_l, Bak, TRAIL, Harakiri o Bid. Algunos ejemplos de enzimas son timidina-cinasa, citosina-desaminasa, hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa. Algunos ejemplos de toxinas son la exotoxina de *Pseudomonas*, la toxina de la difteria, la toxina del cólera, la subunidad A de la toxina pertúsica, la enterotoxina A o la cadena A de la ricina. Otras moléculas con actividad antitumoral incluyen interleucinas (IL) y citocinas, como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, interferón β , interferón α , interferón γ , angiostatina, trombospondina, endostatina, METH-1, METH-2, GM-CSF, G-CSF, M-CSF y factores de necrosis tumoral (TNF) como TNF- α y TNF- β . El experto en la técnica reconocerá que la invención no queda limitada por ninguna proteína concreta de interés, como las desveladas anteriormente, siempre que la proteína tenga un efecto antitumoral.

40 **[0014]** En este documento se describen procedimientos para el tratamiento del cáncer en un sujeto que comprenden (a) proporcionar una construcción de expresión que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica para el cáncer, en que el segmento de ácido nucleico está colocado bajo el control de un promotor Egr-1; (b) administrar la construcción de expresión al sujeto en combinación con un compuesto inductor de radicales libres que daña el ADN, en que el compuesto que daña el ADN induce la expresión de la proteína terapéutica para el cáncer a partir del promotor Egr-1, con lo que se trata el cáncer en el sujeto. La construcción de expresión puede administrarse de manera local o regional al tumor localizado en el sujeto, administrarse por vía sistémica, o por medio de una inyección intratumoral o por inyección directa en la vasculatura tumoral.

50 **[0015]** El compuesto que daña el ADN puede administrarse antes de administrar el vector de expresión, después de administrar el vector de expresión o al mismo tiempo que el vector de expresión. El vector de expresión o el agente que daña el ADN pueden administrarse al menos dos veces. La proteína terapéutica para el cáncer puede ser un supresor tumoral, un inductor de apoptosis, una enzima, una toxina, una citocina o cualquier proteína con actividad antitumoral.

60 **[0016]** En este documento se describen procedimientos para inhibir el crecimiento de una célula tumoral en un sujeto que comprenden (a) proporcionar una construcción de expresión que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica para el cáncer, en que el segmento de ácido nucleico está colocado bajo el control de un promotor Egr-1; (b) administrar la construcción de expresión al sujeto en combinación con un compuesto inductor de radicales libres que daña el ADN, en que el compuesto que daña el ADN induce la expresión de la proteína terapéutica para el cáncer a partir del promotor Egr-1, con lo que se inhibe el crecimiento de la célula

tumoral en el sujeto. En una de estas realizaciones, la proteína terapéutica para el cáncer es TNF- α . En otra de estas realizaciones, el compuesto inductor de radicales libres que daña el ADN es cisplatino.

5 [0017] En este documento se describen procedimientos para destruir una célula tumoral en un sujeto que comprenden (a) proporcionar una construcción de expresión que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica para el cáncer, en que el segmento de ácido nucleico está colocado bajo el control de un promotor Egr-1; (b) administrar la construcción de expresión al sujeto en combinación con un compuesto inductor de radicales libres que daña el ADN, en que el compuesto que daña el ADN induce la expresión de la proteína terapéutica para el cáncer a partir del promotor Egr-1, con lo que se destruye la célula tumoral en el sujeto.

10 [0018] En este documento se describen procedimientos para inhibir la metástasis de una célula tumoral en un sujeto que comprenden (a) proporcionar una construcción de expresión que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica para el cáncer, en que el segmento de ácido nucleico está colocado bajo el control de un promotor Egr-1; (b) administrar la construcción de expresión al sujeto en combinación con un compuesto inductor de radicales libres que daña el ADN, en que el compuesto que daña el ADN induce la expresión de la proteína terapéutica para el cáncer a partir del promotor Egr-1, con lo que se inhibe la metástasis de la célula tumoral en el sujeto.

15 [0019] En este documento se describen procedimientos para reducir la carga tumoral en un sujeto que comprenden (a) proporcionar una construcción de expresión que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica para el cáncer, en que el segmento de ácido nucleico está colocado bajo el control de un promotor Egr-1; (b) administrar la construcción de expresión al sujeto en combinación con un compuesto inductor de radicales libres que daña el ADN, en que el compuesto que daña el ADN induce la expresión de la proteína terapéutica para el cáncer a partir del promotor Egr-1, con lo que se reduce la carga tumoral en el sujeto.

20 [0020] En este documento se describen procedimientos para hacer operable un tumor inoperable que comprenden (a) proporcionar una construcción de expresión que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica para el cáncer, en que el segmento de ácido nucleico está colocado bajo el control de un promotor Egr-1; (b) administrar la construcción de expresión al sujeto en combinación con un compuesto inductor de radicales libres que daña el ADN, en que el compuesto que daña el ADN induce la expresión de la proteína terapéutica para el cáncer a partir del promotor Egr-1, con lo que se reduce el tamaño o la forma del tumor y se le hace susceptible de resección.

25 [0021] Según se usa en este documento, la especificación “un” o “uno/a” quiere decir uno/a o más. Según se usan en este documento en la(s) reivindicación/reivindicaciones, cuando se usan junto con la palabra “comprende”, las palabras “un” o “uno/a” pueden significar uno/a o más de uno/a. Según se usa en este documento, “otro/a” puede significar al menos un(a) segundo/a o más.

30 [0022] Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 [0023] Los dibujos siguientes forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar más detalladamente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la detallada descripción de las realizaciones específicas presentadas en este documento.

40 **FIG. 1. Quimioinducción en células Seg-1.** La fracción del volumen tumoral se mide en función del tiempo y el tratamiento (Seg-1 = línea celular de carcinoma esofágico; UTC = control sin tratar; Ad.Egr.TNF = factor de necrosis tumoral codificado por adenovirus bajo el control del promotor Egr-1; plat = cisplatino a 4 mg/kg; A.TNF/plat = Ad.Egr.TNF + plat).

45 **FIG. 2. Expresión de TNF con quimioinducción.** Producción de TNF en pg/ml en función del tiempo (cinco días o diez días) y el tratamiento (utc = control sin tratar; Ad.TNF = factor de necrosis tumoral codificado por adenovirus bajo el control del promotor Egr-1; Platnm = cisplatino; TNF/Pltm = Ad.TNF + Platnm).

50 **FIG. 3. Inducción de TNF con 4 mg/kg de platino.** Producción de TNF en pg/mg de proteína en función del tiempo (cinco días o diez días) y el tratamiento (Ad.TNF = factor de necrosis tumoral codificado por adenovirus bajo el control del promotor Egr-1; TNF/Pltm = Ad.TNF + cisplatino).

55 **FIG. 4. Respuesta a la dosis de platino en células Seg-1 tratadas con Ad.Egr.TNF.** La fracción del volumen

tumoral se mide en función del tiempo y el tratamiento (Seg-1 = línea celular de carcinoma esofágico; pbs = tampón fosfato salino; Ad.TNF = factor de necrosis tumoral codificado por adenovirus bajo el control del promotor Egr-1; Plat1 = cisplatino a 1 mg/kg; Plat3 = cisplatino a 3 mg/kg; Plat6 = cisplatino a 6 mg/kg; Plat1/TNF = cisplatino a 1 mg/kg + Ad.TNF; Plat3/TNF = cisplatino a 3 mg/kg + Ad.TNF; Plat6/TNF = cisplatino a 6 mg/kg + Ad.TNF).

5

FIGs. 5A y 5B. Medición de la proteína TNF- α *in vitro*. La producción de TNF- α por células infectadas por Ad.Egr.TNF.11D expuestas a IR (5 Gy) o cisplatino (5 μ M) se midió mediante ELISA. Se detectaron niveles significativos de la proteína TNF- α a las 24, 48 y 72 h después de la exposición a Ad.Egr.TNF.11D + IR ($P < 0,001$) y Ad.Egr.TNF.11D + cisplatino ($P < 0,001$) en comparación con el vector solo en cultivos de Seg-1 (FIG. 5A) y cultivos de PROb (FIG. 5B). Los datos se indican como media \pm EEM.

10

FIGs. 6A y 6B. Ensayos indicadores *in vitro*. Se usaron construcciones indicadoras con luciferasa para evaluar la inducción del promotor Egr-1 por IR o cisplatino. Fue posible detectar una actividad luciferasa mínima después de la transfección con las construcciones plasmídicas pGL3 (control negativo) o pGL3 660 (promotor Egr-1 mínimo). FIG. 6A. En las células Seg-1 se observó un aumento de la actividad luciferasa relativa de 2,4 veces ($P = 0,005$) después de la exposición a IR (20 Gy) y un aumento de 2.0 veces ($P = 0,005$) después de la exposición a cisplatino (50 μ M). FIG. 6B. En las células PROb se observó un aumento de la actividad luciferasa relativa de 4,2 veces ($P = 0,004$) después de la exposición a IR (20 Gy) y un aumento de 3,6 veces ($P = 0,01$) después de la exposición a cisplatino (50 μ M). Los datos se indican como media \pm EEM.

15

20

FIGs 7A y 7B. Medición de la proteína TNF- α *in vivo*. La producción de TNF- α por xenoinjertos inyectados con Ad.Egr.TNF.11D se midió mediante ELISA. Se observó un aumento significativo de la concentración intratumoral de la proteína TNF- α después del tratamiento combinado con Ad.Egr.TNF.11D + cisplatino en comparación con el tratamiento con el vector Ad.Egr.TNF.11D solo en xenoinjertos de células Seg-1 (FIG. 7A) (aumento de 3,5 veces; $P < 0,05$) y PROb (FIG. 7B) (aumento de 2,7 veces; $P < 0,001$). Los datos se indican como media \pm EEM.

25

FIGs 8A y 8B. Estudios de nuevo crecimiento *in vivo*. Se evaluó el efecto del tratamiento combinado con Ad.Egr.TNF.11D y cisplatino por medición del volumen de los xenoinjertos inyectados con Ad.Null.3511.11D o Ad.Egr.TNF.11D con o sin cisplatino. FIG. 8A. En los xenoinjertos de Seg-1, el tratamiento combinado con Ad.Egr.TNF.11D + cisplatino produjo una regresión tumoral significativa en comparación con los tumores tratados con Ad.Null + cisplatino en los días 4 ($P = 0,045$), 6 ($P < 0,005$), 8 ($P < 0,002$), 10 ($P < 0,001$), 12 ($P < 0,004$) y 14 ($P < 0,021$). FIG. 8B. En los xenoinjertos de PROb se observó una regresión tumoral significativa en los tumores que recibieron un tratamiento combinado con Ad.Egr.TNF.11D + cisplatino en comparación con los tumores tratados con Ad.Null + cisplatino en los días 4 ($P = 0,045$), 6 ($P < 0,001$), 8 ($P = 0,048$), 10 ($P < 0,001$), 12 ($P < 0,001$) y 14 ($P < 0,002$). Los datos se indican como media \pm EEM.

30

35

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

[0024] La presente invención procede en parte de la observación de los inventores de que el promotor Egr-1, que desde hace tiempo se sabe que contiene elementos de respuesta a la radiación, puede ser inducido también por compuestos químicos que dañan el ADN. Esta sorprendente observación proporciona una terapia combinada no probada hasta ahora para enfermedades hiperproliferativas como el cáncer, mediante el uso de una construcción de expresión que contiene el promotor Egr-1 y codifica un gen antitumoral como un factor de necrosis tumoral (TNF) en combinación con un compuesto químico que daña el ADN.

40

45

[0025] El efecto terapéutico combinado del agente que daña el ADN según se reivindica y la expresión inducida del gen terapéutico en las células cancerosas proporciona un resultado superior al uso de cada uno de los agentes en solitario y permite también el uso de dosis reducidas de cada agente. La posibilidad de reducir cualquier toxicidad sistémica al reducir la cantidad de radiación y/o fármaco y/o vector administrados es muy ventajosa. La siguiente memoria proporciona una descripción detallada de las realizaciones anteriores, así como variaciones de las mismas.

50

[0026] Se proporciona una estrategia de direccionamiento transcripcional en la que pueden usarse agentes quimioterapéuticos en combinación con vectores de expresión inducibles que codifican genes con efectos antitumorales para tratar tumores eficazmente, en que los vectores son inducidos por el agente quimioterapéutico. Por lo tanto, se proporcionan construcciones de expresión que comprenden el promotor inducible Egr-1 y que codifican cualquier gen antitumoral en combinación con un agente quimioterapéutico que puede inducir y activar el promotor Egr-1 por medio de daños en el ADN o la producción de ROI.

55

[0027] Con un vector que se dirige selectivamente al tumor, una construcción genética que expresa un gen antitumoral inducible por un agente quimioterapéutico aumenta los efectos del agente quimioterapéutico al igual que del agente antitumoral. Dado que el agente quimioterapéutico y el gen antitumoral tendrán generalmente

60

mecanismos diferentes de destrucción de las células tumorales, las células resistentes a un agente pueden ser sensibles al otro. También se considera que tales combinaciones pueden aumentar los efectos locales de la combinación de quimio y radioterapia o de otras terapias auxiliares para el cáncer.

5 A. Promotor Egr-1

[0028] El promotor Egr-1 se define en este documento como aquellas secuencias reguladoras en el extremo 5' necesarias para controlar la transcripción inducida por el agente que daña el ADN de las secuencias posteriores conectadas operativamente a estas. El promotor Egr-1 tiene una estructura compleja que ha sido analizada
10 previamente en el contexto de la expresión génica inducida por radiación y H₂O₂. Contiene múltiples sitios de unión de ETS (ETS son proteínas de regulación transcripcional), tres de los cuales existen como partes de dos elementos de respuesta al suero (SRE), SREI y SREII. Los SRE, también conocidos como motivos CArG, son elementos en *cis* que regulan la expresión de muchos genes que responden a factores de crecimiento. Hay un total de seis SRE, cada uno de los cuales comprende la secuencia consenso CC(secuencia rica en A + T)6GG.

15 **[0029]** Los presentes inventores han demostrado previamente que una construcción genética quimérica que consta de los elementos CArG de Egr-1 en el extremo 5' ligados al ADNc de TNF- α expresa grandes cantidades de TNF- α intratumoral después de la exposición a IR de las células transducidas con esta construcción. Los tumores transducidos con la construcción quimérica Egr-TNF y tratados con IR mostraron aumentos en la regresión/curas en
20 comparación con los tumores tratados con cualquiera de los agentes en solitario, probablemente debido a la inducción intratumoral de la producción de TNF- α por IR y a la interacción citotóxica de TNF- α e IR en las células tumorales y en la vasculatura tumoral (Weichselbaum y col., 2001; Staba y col., 1998). En la presente invención, los inventores usaron cisplatino, un agente quimioterapéutico de uso común que altera la formación intracelular del radical oxígeno y daña el ADN, para inducir el gen TNF- α bajo el control de los elementos CArG del promotor Egr-1
25 inducibles por daños en el ADN o por ROI. Por lo tanto, la invención proporciona el uso de agentes que causan daños en el ADN y/o producen ROI para inducir Egr-1 y, por tanto, activar la expresión de genes bajo el control de Egr-1 en vectores de expresión.

B. Compuestos químicos que dañan el ADN

30 **[0030]** El término "compuesto químico que daña el ADN" se refiere a cualquier fármaco que induce daños, directa o indirectamente, en una molécula de ADN. De particular interés en la presente invención son aquellos fármacos que generan radicales libres. Se cree que las siguientes categorías de compuestos químicos causan daños en el ADN por una o varias vías.

35 I. Agentes alquilantes

[0031] Los agentes alquilantes son fármacos que interactúan directamente con el ADN genómico para impedir la proliferación de la célula cancerosa. Esta categoría de fármacos quimioterapéuticos representa agentes
40 que afectan a todas las fases del ciclo celular, es decir, no son específicos de una fase. Los agentes alquilantes pueden emplearse para tratar, por ejemplo, leucemia crónica, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple y cánceres particulares de mama, pulmón y ovario. Un agente alquilante puede incluir, pero no se limita a una mostaza nitrogenada, una etilenimina, una metilmelamina, un alquilsulfonato, una nitrosourea o triazinas.

45 **[0032]** Incluyen, pero no se limitan a: busulfán, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida (Cytosan), dacarbazina, ifosfamida, mecloretamina (mustargén) y melfalán. En aspectos específicos, puede usarse troglitazona para tratar el cáncer en combinación con uno cualquiera o más de estos agentes alquilantes, algunos de los cuales se discuten más adelante.

50 i. Mostazas nitrogenadas

[0033] Una mostaza nitrogenada puede ser, pero no se limita a mecloretamina (HN₂), que se usa para la enfermedad de Hodgkin y linfomas no Hodgkin; ciclofosfamida y/o ifosfamida, que se usan para el tratamiento de
55 cánceres como leucemias linfocíticas agudas o crónicas, la enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, cánceres de mama, ovario y pulmón, tumor de Wilm, sarcomas de cérvix, de testículos y de tejidos blandos; melfalán (L-sarcolisina), que se ha usado para el tratamiento de cánceres como el mieloma múltiple, el cáncer de mama y de ovario; clorambucilo, que se ha usado para el tratamiento de enfermedades como, por ejemplo la leucemia linfática (linfocítica) crónica, linfomas malignos como linfosarcoma, linfoma folicular gigante, la enfermedad de Hodgkin y linfomas no Hodgkin.

60

a. Clorambucilo

[0034] El clorambucilo (también conocido como Leukeran) es un agente alquilante bifuncional del tipo de las mostazas nitrogenadas para el que se ha observado actividad contra enfermedades neoplásicas humanas seleccionadas. El clorambucilo se conoce químicamente como ácido 4-[bis(2-cloroetil)amino]bencenobutanoico.

[0035] El clorambucilo está disponible en forma de comprimido para administración por vía oral. Se absorbe rápida y totalmente por el tracto gastrointestinal. Por ejemplo, después de una sola dosis por vía oral de aproximadamente 0,6 mg/kg a aproximadamente 1,2 mg/kg, las concentraciones máximas de clorambucilo en el plasma se alcanzan en el espacio de una hora y la semivida terminal del fármaco parental se estima en aproximadamente 1,5 horas. Para el tratamiento antineoplásico pueden usarse de aproximadamente 0,1 mg/kg/día a aproximadamente 0,2 mg/kg/día o de aproximadamente 3,6 mg/m²/día a aproximadamente 6 mg/m²/día o alternativamente aproximadamente 0,4 mg/kg. El clorambucilo no es curativo por sí mismo, pero puede producir una paliación de utilidad clínica.

b. Ciclofosfamida

[0036] La ciclofosfamida es monohidrato de *N,N*-bis(2-cloroetil)tetrahidro-2-óxido-2*H*-1,3,2-oxazafosforin-2-amina; con la denominación Cytoxan puede adquirirse de Mead Johnson y como Neosar de Adria. La ciclofosfamida se prepara por la condensación de 3-amino-1-propanol con dicloruro de *N,N*-bis(2-cloroetil)fosforamida [(ClCH₂CH₂)₂N-POCl₂] en una disolución de dioxano con la actividad catalítica de trietilamina. La condensación es doble e implica los grupos hidroxilo y los grupos amino, con el resultado de una ciclación.

[0037] A diferencia de otros alquilantes de β-cloroetilamina, no se cicla fácilmente para dar la forma activa de etilenimonio hasta ser activada por enzimas hepáticas. Por lo tanto, la sustancia es estable en el tracto gastrointestinal, se tolera bien y es eficaz en las vías oral y parenteral, sin causar vesicación local, necrosis, flebitis o incluso dolor.

[0038] Las dosis orales adecuadas para adultos incluyen, por ejemplo de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 5 mg/kg/día (usualmente en combinación), dependiendo de la tolerancia gastrointestinal; o de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día; las dosis intravenosas incluyen, por ejemplo inicialmente de aproximadamente 40 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, en dosis divididas durante un periodo de aproximadamente dos días a aproximadamente cinco días o de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg aproximadamente cada siete días a aproximadamente diez días o de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg dos veces a la semana o de aproximadamente 1,5 mg/kg/día a aproximadamente 3 mg/kg/día. En algunos aspectos, puede administrarse una dosis de aproximadamente 250 mg/kg/día como antineoplásico. Debido a los efectos adversos gastrointestinales, se prefiere la vía intravenosa para la carga. Durante el mantenimiento se desea normalmente un recuento de leucocitos de aproximadamente 3.000/mm³ a aproximadamente 4.000/mm³. El fármaco también se administra a veces por vía intramuscular, por infiltración o en cavidades corporales. Está disponible en formas de dosificación para inyección de aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg y aproximadamente 500 mg y en comprimidos de aproximadamente 25 mg y aproximadamente 50 mg.

c. Melfalán

[0039] El melfalán, también conocido como Alkeran, mostaza de L-fenilalanina, mostaza de fenilalanina, L-PAM o L-sarcolisina es un derivado fenilalanínico de mostaza nitrogenada. Melfalán es un agente alquilante bifuncional que es activo contra enfermedades neoplásicas humanas selectivas. Se conoce químicamente como 4-[bis(2-cloroetil)amino]-L-fenilalanina.

[0040] El melfalán es el isómero L activo del compuesto y fue sintetizado por primera vez en 1953 por Bergel y Stock; el isómero D, conocido como medfalán, es menos activo contra ciertos tumores animales y la dosis necesaria para producir efectos en los cromosomas es mayor que la requerida con el isómero L. La forma racémica (DL-) se conoce como merfalán o sarcolisina. El melfalán es insoluble en agua y tiene un pK_{a1} de aproximadamente 2,1. Melfalán está disponible en forma de comprimidos para administración por vía oral y se ha usado para el tratamiento del mieloma múltiple. La evidencia disponible sugiere que de aproximadamente un tercio a la mitad de los pacientes con mieloma múltiple muestran una respuesta favorable a la administración del fármaco por vía oral.

[0041] El melfalán se ha usado en el tratamiento del carcinoma ovárico epitelial. Un régimen de tratamiento empleado comúnmente para el carcinoma ovárico ha sido la administración de melfalán a una dosis de aproximadamente 0,2 mg/kg diariamente durante cinco días como un único ciclo. Los ciclos se repiten aproximadamente cada cuatro a cinco semanas, dependiendo de la tolerancia hematológica (Smith y Rutledge,

1975; Young y col., 1978). Alternativamente, en ciertas realizaciones la dosis de melfalán usada podría ser tan baja como aproximadamente 0,05 mg/kg/día o tan alta como aproximadamente 3 mg/kg/día o superior.

ii. Etileniminas y metilmelaminas

5

[0042] Una etilenimina y/o una metilmelamina incluyen, pero no se limitan a hexametilmelamina, usada para el tratamiento del cáncer de ovario, y tiotepa, que se ha usado para el tratamiento del cáncer de vejiga, mama y ovario.

iii. Alquilsulfonatos

10

[0043] Un alquilsulfonato incluye, pero no se limita a fármacos como busulfán, que se ha usado para el tratamiento de la leucemia granulocítica crónica. El busulfán (conocido también como Myleran) es un agente alquilante bifuncional. El busulfán se conoce químicamente como dimetanosulfonato de 1,4-butanodiol. Está disponible en forma de comprimidos para administración por vía oral, en que, por ejemplo, cada comprimido

15

ranurado contiene aproximadamente 2 mg de busulfán y los ingredientes inactivos estearato de magnesio y cloruro de sodio.

[0044] Busulfán está indicado para el tratamiento paliativo de la leucemia mielógena (mieloide, mielocítica, granulocítica) crónica. Aunque no es curativo, el busulfán reduce la masa granulocítica total, alivia los síntomas de la enfermedad y mejora el estado clínico del paciente. Aproximadamente el 90 % de los adultos con leucemia mielógena crónica no tratados previamente obtendrán una remisión hematológica con regresión o estabilización de la organomegalia después del uso de busulfán. Se ha demostrado que el busulfán es superior a la irradiación esplénica con respecto a los tiempos de supervivencia y al mantenimiento de los niveles de hemoglobina y que es equivalente a la irradiación en el control de la esplenomegalia.

20

25

iv. Nitrosoureas

[0045] Las nitrosoureas, como agentes alquilantes, inhiben las proteínas de reparación del ADN. Se usan para el tratamiento de linfomas no Hodgkin, mieloma múltiple, melanoma maligno, además de tumores cerebrales.

30

[0046] Una nitrosourea incluye, pero no se limita a carmustina (BCNU), lomustina (CCNL), semustina (metil-CCNU) o estreptozocina. La semustina se ha usado en cánceres como un tumor cerebral primario, un cáncer de estómago o de colon. La estreptozocina se ha usado para el tratamiento de enfermedades como un insulinoma pancreático maligno o un carcinoide maligno. La estreptozocina se ha usado para el tratamiento de cánceres como

35

un melanoma maligno, la enfermedad de Hodgkin y sarcomas de tejidos blandos.

a. Carmustina

[0047] La carmustina (carmustina estéril) es una de las nitrosoureas usadas en el tratamiento de ciertas enfermedades neoplásicas. Es 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea. Consta de escamas o de masa coagulada de color amarillo pálido con un peso molecular de 214,06. Es muy soluble en alcohol y en lípidos y poco soluble en agua. La carmustina se administra por infusión intravenosa después de reconstituirla según se recomiende.

40

[0048] Aunque se acepta generalmente que la carmustina alquila el ADN y el ARN, no muestra resistencia cruzada con otros alquilantes. Al igual que otras nitrosoureas, puede inhibir también varios procesos enzimáticos clave por carbamoylación de aminoácidos en proteínas.

45

[0049] La carmustina está indicada como terapia paliativa como agente único o en terapia combinada establecida con otros agentes quimioterapéuticos aprobados en tumores cerebrales como glioblastoma, glioma del tronco encefálico, meduloblastoma, astrocitoma, ependimoma y tumores cerebrales metastásicos. También se ha usado en combinación con prednisona para el tratamiento del mieloma múltiple. La carmustina se ha usado en el tratamiento de cánceres como un mieloma múltiple o un melanoma maligno. La carmustina ha demostrado ser útil en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin y en linfomas no Hodgkin, como terapia secundaria en combinación con otros fármacos aprobados en pacientes que recaen mientras están siendo tratados con la terapia primaria o que no responden a la terapia primaria.

50

55

[0050] La carmustina estéril está normalmente disponible en viales de una sola dosis de 100 mg de material liofilizado. La dosis recomendada de carmustina como agente único en pacientes no tratados previamente es de aproximadamente 150 mg/m² a aproximadamente 200 mg/m² por vía intravenosa cada seis semanas. Puede administrarse como dosis única o dividida en inyecciones diarias de aproximadamente 75 mg/m² hasta aproximadamente 100 mg/m² en dos días sucesivos. Cuando se usa carmustina en combinación con otros fármacos mielosupresores o en pacientes cuya reserva de médula ósea está reducida, las dosis deberán ajustarse de la

60

manera correspondiente. Las dosis posteriores a la dosis inicial deberán ajustarse de acuerdo con la respuesta hematológica del paciente a la dosis precedente. Por supuesto, se entiende que en la presente invención pueden usarse otras dosis, por ejemplo de aproximadamente 10 mg/m², aproximadamente 20 mg/m², aproximadamente 30 mg/m², aproximadamente 40 mg/m², aproximadamente 50 mg/m², aproximadamente 60 mg/m², aproximadamente 70 mg/m², aproximadamente 80 mg/m², aproximadamente 90 mg/m² a aproximadamente 100 mg/m².

b. Lomustina

[0051] La lomustina es una de las nitrosoureas usadas en el tratamiento de ciertas enfermedades neoplásicas. Es 1-(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrosourea. Es un polvo amarillo con la fórmula empírica C₉H₁₆ClN₃O₂ y un peso molecular de 233,71. La lomustina es soluble en etanol al 10 % (aproximadamente 0,05 mg/ml) y en alcohol absoluto (aproximadamente 70 mg/ml). La lomustina es relativamente insoluble en agua (menos de aproximadamente 0,05 mg/ml). Está relativamente sin ionizar a pH fisiológico. Los ingredientes inactivos de las cápsulas de lomustina son estearato de magnesio y manitol.

[0052] Aunque en general se acepta que la lomustina alquila el ADN y el ARN, no muestra resistencia cruzada con otros alquilantes. Al igual que otras nitrosoureas, puede inhibir varios procesos enzimáticos clave por carbamoylación de aminoácidos en proteínas.

[0053] La lomustina puede administrarse por vía oral. Después de la administración por vía oral de lomustina radiactiva a dosis en el intervalo de aproximadamente 30 mg/m² a 100 mg/m², aproximadamente la mitad de la radiactividad administrada se excretó en forma de productos de degradación en el espacio de 24 horas. La semivida en suero de los metabolitos varía desde aproximadamente 16 horas a aproximadamente 2 días. Las concentraciones en los tejidos son comparables a las concentraciones en el plasma 15 minutos después de la administración por vía intravenosa.

[0054] Se ha demostrado que la lomustina es útil como agente único además de otras modalidades de tratamiento o en terapia combinada establecida con otros agentes quimioterapéuticos aprobados en tumores cerebrales tanto primarios como metastásicos, en pacientes que ya han sido sometidos a procedimientos quirúrgicos y/o radioterapéuticos apropiados. La lomustina se ha usado para el tratamiento de cánceres como el cáncer de pulmón microcítico. También ha demostrado ser eficaz como terapia secundaria contra la enfermedad de Hodgkin en combinación con otros fármacos aprobados en pacientes que recaen mientras están siendo tratados con la terapia primaria o que no responden a la terapia primaria.

[0055] La dosis recomendada de lomustina en adultos y niños como agente único en pacientes no tratados previamente es de aproximadamente 130 mg/m², como una dosis única por vía oral cada seis semanas. En los individuos con una actividad deficiente de la médula ósea, la dosis deberá reducirse a aproximadamente 100 mg/m² cada seis semanas. Si la lomustina se usa en combinación con otros fármacos mielosupresores, las dosis deberán ajustarse de la manera correspondiente. Se entiende que pueden usarse otras dosis, por ejemplo de aproximadamente 20 mg/m², aproximadamente 30 mg/m², aproximadamente 40 mg/m², aproximadamente 50 mg/m², aproximadamente 60 mg/m², aproximadamente 70 mg/m², aproximadamente 80 mg/m², aproximadamente 90 mg/m², aproximadamente 100 mg/m² a aproximadamente 120 mg/m².

c. Triazinas

[0056] Las triazinas incluyen, pero no se limitan a aquellos fármacos como dacarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazolcarboxamida, usados en el tratamiento de cánceres como un melanoma maligno, la enfermedad de Hodgkin y un sarcoma de tejidos blandos.

50 II. Antimetabolitos

[0057] Los antimetabolitos interrumpen la síntesis del ADN y el ARN. A diferencia de los agentes alquilantes, afectan específicamente al ciclo celular durante la fase S. Se han usado para combatir leucemias crónicas, además de tumores de mama, de ovario y del tracto gastrointestinal. Los antimetabolitos pueden diferenciarse en diversas categorías, como análogos del ácido fólico, análogos de pirimidina y análogos de purina y compuestos inhibidores relacionados. Los antimetabolitos incluyen, pero no se limitan a 5-fluorouracilo (5-FU), citarabina (Ara-C), fludarabina, gemcitabina y metotrexato.

i. Análogos de ácido fólico

[0058] Los análogos de ácido fólico incluyen, pero no se limitan a compuestos como metotrexato (ametofterina), que se ha usado en el tratamiento de cánceres como la leucemia linfocítica aguda, el

coriocarcinoma, micosis fungoides, el cáncer de mama, de cabeza y cuello, de pulmón y el sarcoma osteogénico.

ii. Análogos de pirimidina

5 **[0059]** Los análogos de pirimidina incluyen compuestos como citarabina (arabinosilcitosina), 5-fluorouracilo (fluorouracilo; 5-FU) y floxuridina (fluorodesoxiuridina; FudR). La citarabina se ha usado en el tratamiento de cánceres como la leucemia granulocítica aguda y leucemias linfocíticas agudas. La floxuridina y el 5-fluorouracilo se han usado en el tratamiento de cánceres como el cáncer de mama, de colon, de estómago, de páncreas, de ovario, de cabeza y cuello, de vejiga urinaria y lesiones cutáneas tóxicas premalignas.

10

[0060] El nombre químico del 5-fluorouracilo (5-FU) es 5-fluoro-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona. Se piensa que su mecanismo de acción es el bloqueo de la reacción de metilación del ácido desoxirribonucleico para dar ácido timidílico. Por lo tanto, 5-FU interfiere con la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) y en menor medida inhibe la formación de ácido ribonucleico (ARN). Dado que el ADN y el ARN son esenciales para la división y la proliferación celular, se piensa que el efecto de 5-FU es crear una deficiencia de timidina que conduce a la muerte celular. Por lo tanto, el efecto de 5-FU se encuentra en células que se dividen rápidamente, una característica de los cánceres metastásicos.

15

iii. Análogos de purina e inhibidores relacionados

20

[0061] Los análogos de purina y los compuestos relacionados incluyen, pero no se limitan a mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-tioguanina; TG) y pentostatina (2-desoxicoformicina). La mercaptopurina se ha usado en leucemias linfocíticas agudas, leucemias granulocíticas agudas y leucemias granulocíticas crónicas. La tioguanina se ha usado en el tratamiento de cánceres como la leucemia granulocítica aguda, la leucemia linfocítica aguda y la leucemia linfocítica crónica. La pentostatina se ha usado en cánceres como la leucemia de células pilosas, micosis fungoides y la leucemia linfocítica crónica.

25

III. Productos naturales

30 **[0062]** Los productos naturales se refieren generalmente a compuestos aislados originalmente de una fuente natural e identificados como poseedores de actividad farmacológica. Estos compuestos, análogos y derivados de los mismos pueden aislarse de una fuente natural, sintetizarse químicamente o producirse de manera recombinante por cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Los productos naturales incluyen categorías como inhibidores mitóticos, antibióticos antitumorales, enzimas y modificadores de la respuesta biológica.

35

i. Inhibidores mitóticos

[0063] Los inhibidores mitóticos incluyen alcaloides vegetales y otros agentes naturales que pueden inhibir la síntesis de proteínas requerida para la división celular o la mitosis. Operan durante una fase específica del ciclo celular. Los inhibidores mitóticos incluyen, por ejemplo, docetaxel, etopósido (VP16), tenipósido, paclitaxel, taxol, vinblastina, vincristina y vinorelbina.

40

a. Epipodofilotoxinas

45 **[0064]** Las epipodofilotoxinas incluyen aquellos compuestos como tenipósido y VP16. VP16 se conoce también como etopósido y se usa primariamente para el tratamiento de tumores testiculares en combinación con bleomicina y cisplatino y en combinación con cisplatino para el carcinoma de pulmón microcítico. Tenipósido y VP16 son activos también contra cánceres como el cáncer de testículos, otros cánceres de pulmón, la enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, la leucemia granulocítica aguda, la leucemia no linfocítica aguda, el carcinoma de mama y el sarcoma de Kaposi asociado con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

50

[0065] VP16 está disponible como disolución (p. ej., 20 mg/ml) para administración por vía intravenosa y como cápsulas rellenas de líquido de 50 mg para administración por vía oral. Para el carcinoma de pulmón microcítico, la dosis intravenosa (en terapia combinada) puede ser tan alta como de aproximadamente 100 mg/m² o tan baja como de aproximadamente 2 mg/m², rutinariamente se ha usado también desde aproximadamente 35 mg/m² diariamente durante aproximadamente cuatro días a aproximadamente 50 mg/m² diariamente durante aproximadamente cinco días. Cuando se administra por vía oral, la dosis debe duplicarse. Por consiguiente, las dosis para el carcinoma de pulmón microcítico puede ser tan alta como de aproximadamente 200 mg/m² a aproximadamente 250 mg/m². La dosis intravenosa para el cáncer testicular (en terapia combinada) es de aproximadamente 50 mg/m² a aproximadamente 100 mg/m² diariamente durante aproximadamente cinco días o de aproximadamente 100 mg/m² en días alternos en tres dosis. Normalmente, los ciclos de la terapia se repiten aproximadamente cada tres o cuatro semanas. El fármaco debe administrarse lentamente (p. ej., en aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60

60

minutos) como infusión para evitar hipotensión y broncoespasmo, debidos probablemente a los disolventes usados en la formulación.

b. Taxoides

5

[0066] Los taxoides son una clase de compuestos relacionados aislados de la corteza del fresno, *Taxus brevifolia*. Los taxoides incluyen, pero no se limitan a compuestos como docetaxel y paclitaxel.

[0067] Paclitaxel se une a la tubulina (en un sitio distinto al usado por los alcaloides de vinca) y estimula el ensamblaje de microtúbulos. El paclitaxel se está evaluando clínicamente; tiene actividad contra el melanoma maligno y el carcinoma de ovario. En ciertos aspectos, las dosis máximas son de aproximadamente 30 mg/m² y día durante aproximadamente cinco días o de aproximadamente 210 mg/m² a 250 mg/m² administrados una vez aproximadamente cada tres semanas.

15 c. Alcaloides de vinca

[0068] Los alcaloides de vinca son un tipo de alcaloide vegetal para los que se ha identificado una actividad farmacéutica. Incluyen compuestos como vinblastina (VLB) y vincristina.

20 1. Vinblastina

[0069] La vinblastina es un ejemplo de un alcaloide vegetal que puede usarse para el tratamiento del cáncer y el precáncer. Cuando las células se incuban con vinblastina se produce la disolución de los microtúbulos.

25 [0070] Se ha descrito una absorción impredecible después de la administración de vinblastina y vincristina por vía oral. A las dosis clínicas normales, la concentración máxima de cada fármaco en el plasma es de aproximadamente 0,4 mM. La vinblastina y la vincristina se unen a las proteínas del plasma. Están ampliamente concentradas en las plaquetas y en menor medida en los leucocitos y eritrocitos.

30 [0071] Después de una inyección intravenosa, la vinblastina presenta un patrón multifásico de aclaramiento del plasma; después de la distribución, el fármaco desaparece del plasma con semividas aproximadas de 1 y 20 horas. La vinblastina se metaboliza en el hígado para dar el derivado activado biológicamente desacetilvinblastina. Aproximadamente el 15 % de una dosis administrada se detecta intacta en la orina y aproximadamente el 10 % se recupera en las heces después de la excreción biliar. Las dosis deben reducirse en pacientes con insuficiencia hepática. Una reducción de la dosis de al menos el 50 % es indicada si la concentración de bilirrubina en el plasma es superior a 3 mg/dl (aproximadamente 50 mM).

40 [0072] El sulfato de vinblastina está disponible en preparaciones para inyección. Cuando el fármaco se administra por vía intravenosa, deben tomarse precauciones especiales contra la extravasación subcutánea, ya que esta puede causar una irritación dolorosa y ulceración. El medicamento no debe inyectarse en una extremidad con circulación deficiente. Después de una única dosis de 0,3 mg/kg de peso corporal, la mielosupresión alcanza el máximo en un tiempo de aproximadamente siete días a aproximadamente diez días. Si no se alcanza un nivel moderado de leucopenia (aproximadamente 3.000 células/mm³), la dosis semanal puede aumentarse gradualmente con incrementos de aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal. En regímenes diseñados para la cura del **45** cáncer testicular la vinblastina se usa en dosis de aproximadamente 0,3 mg/kg de peso corporal aproximadamente cada tres semanas, independientemente del número de células sanguíneas o de la toxicidad.

[0073] Un uso clínico importante de la vinblastina es junto con bleomicina y cisplatino en la terapia curativa de tumores testiculares metastásicos. Se han descrito respuestas beneficiosas en varios linfomas, particularmente en la **50** enfermedad de Hodgkin, en la que se puede observar una mejora en el 50 al 90 % de los casos. La eficacia de la vinblastina en una elevada proporción de linfomas no disminuye cuando la enfermedad es resistente a agentes alquilantes. También es activa en el sarcoma de Kaposi, el cáncer de testículos, el neuroblastoma y la enfermedad de Letterer-Siwe (histiocitosis X), así como en el carcinoma de mama y el coriocarcinoma en mujeres.

55 [0074] Pueden administrarse dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,3 mg/kg o también de aproximadamente 1,5 mg/m² a aproximadamente 2 mg/m². Alternativamente, pueden administrarse de aproximadamente 0,1 mg/m², aproximadamente 0,12 mg/m², aproximadamente 0,14 mg/m², aproximadamente 0,15 mg/m², aproximadamente 0,2 mg/m², aproximadamente 0,25 mg/m², aproximadamente 0,5 mg/m², aproximadamente 1,0 mg/m², aproximadamente 1,2 mg/m², aproximadamente 1,4 mg/m², aproximadamente 1,5 **60** mg/m², aproximadamente 2,0 mg/m², aproximadamente 2,5 mg/m², aproximadamente 5,0 mg/m², aproximadamente 6,0 mg/m², aproximadamente 8 mg/m², aproximadamente 9 mg/m², aproximadamente 10 mg/m² a aproximadamente 20 mg/m².

2. Vincristina

5 **[0075]** La vincristina bloquea la mitosis y produce una parada metafásica. Parece probable que la mayoría de las actividades biológicas de este fármaco puedan explicarse por su capacidad de unirse específicamente a la tubulina y bloquear la capacidad de la proteína de polimerizar para formar microtúbulos. Por la alteración de los microtúbulos del aparato mitótico, la división celular se detiene en la metafase. Presumiblemente, la incapacidad de segregar los cromosomas correctamente durante la mitosis conduce a la muerte celular.

10 **[0076]** La relativamente baja toxicidad de la vincristina para las células de la médula y las células epiteliales normales hace que este agente sea poco usual entre los fármacos antineoplásicos y a menudo se incluye en combinación con otros agentes mielosupresores. Se ha descrito una absorción impredecible después de la administración de vinblastina y vincristina por vía oral. A las dosis clínicas usuales, la concentración máxima de cada fármaco en el plasma es de aproximadamente 0,4 mM.

15 **[0077]** La vinblastina y la vincristina se unen a las proteínas del plasma. Están ampliamente concentradas en las plaquetas y en menor medida en los leucocitos y eritrocitos. La vincristina tiene un patrón multifásico de aclaramiento del plasma; la semivida terminal es de aproximadamente 24 horas. El fármaco se metaboliza en el hígado pero no se han identificado derivados biológicamente activos. Las dosis deben reducirse en pacientes con insuficiencia hepática. Una reducción de la dosis de al menos el 50 % es indicada si la concentración de bilirrubina en el plasma es superior a aproximadamente 3 mg/dl (aproximadamente 50 mM).

20 **[0078]** El sulfato de vincristina está disponible como disolución (p. ej., 1 mg/ml) para inyección intravenosa. La vincristina usada conjuntamente con corticosteroides es el tratamiento elegido actualmente para inducir remisiones en la leucemia infantil; las dosis óptimas para estos fármacos parecen ser aproximadamente 2 mg/m² de superficie corporal de vincristina por vía intravenosa semanalmente y aproximadamente 40 mg/m² de prednisona por vía oral diariamente. Los pacientes adultos con la enfermedad de Hodgkin o con linfomas no Hodgkin reciben normalmente vincristina como parte de un protocolo complejo. Si se usa en el régimen MOPP, la dosis recomendada de vincristina es de aproximadamente 1,4 mg/m². Las altas dosis de vincristina parecen tolerarse mejor por niños con leucemia que por adultos, que pueden experimentar una grave toxicidad neurológica. Una administración del fármaco con una frecuencia mayor que cada siete días o a dosis mayores parece aumentar las manifestaciones tóxicas sin una mejora proporcional de la tasa de respuesta. También deben tomarse precauciones para evitar la extravasación durante la administración de vincristina por vía intravenosa. La vincristina (y la vinblastina) pueden infundirse en el suministro sanguíneo arterial de los tumores a dosis varias veces superiores a las que pueden administrarse por vía intravenosa con toxicidad comparable.

35 **[0079]** La vincristina ha resultado eficaz para la enfermedad de Hodgkin y otros linfomas. Aunque parece ser algo menos beneficiosa que la vinblastina cuando se usa en solitario en la enfermedad de Hodgkin, usada junto con mecloretamina, prednisona y procarbazona (el régimen denominado MOPP), es el tratamiento preferido para los estados avanzados (III y IV) de esta enfermedad. La vincristina es un agente importante en los linfomas no Hodgkin, particularmente cuando se usa junto con ciclofosfamida, bleomicina, doxorubicina y prednisona. La vincristina es más útil que la vinblastina en la leucemia linfocítica. Se ha descrito una respuesta beneficiosa en pacientes con una diversidad de otros neoplasmas, en particular, el tumor de Wilm, neuroblastoma, tumores cerebrales, rhabdomyosarcoma, cáncer de pulmón microcítico y carcinomas de mama, de vejiga y de los sistemas reproductores masculino y femenino.

45 **[0080]** Las dosis de vincristina incluyen de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,03 mg/kg o pueden administrarse de 0,4 mg/m² a aproximadamente 1,4 mg/m² o también de aproximadamente 1,5 mg/m² a aproximadamente 2 mg/m². Alternativamente, en ciertas realizaciones pueden administrarse aproximadamente 0,02 mg/m², aproximadamente 0,05 mg/m², aproximadamente 0,06 mg/m², aproximadamente 0,07 mg/m², aproximadamente 0,08 mg/m², aproximadamente 0,1 mg/m², aproximadamente 0,12 mg/m², aproximadamente 0,14 mg/m², aproximadamente 0,15 mg/m², aproximadamente 0,2 mg/m², aproximadamente 0,25 mg/m², como infusión continua por vía intravenosa.

55 d. Antibióticos antitumorales

60 **[0081]** Los antibióticos antitumorales tienen actividad tanto antimicrobiana como citotóxica. Estos fármacos interfieren también con el ADN por inhibición química de enzimas y de la mitosis o por alteración de las membranas celulares. Estos agentes no son específicos de una fase, de modo que actúan en todas las fases del ciclo celular. Por lo tanto, se usan ampliamente para diversos cánceres. Algunos ejemplos de antibióticos antitumorales incluyen, pero no se limitan a bleomicina, dactinomicina y plicamicina (mitramicina). Estos compuestos se usan ampliamente en el ámbito clínico para el tratamiento de neoplasmas y generalmente se administran mediante una inyección

intravenosa en embolada o por vía oral.

1. Mitomicina

5 [0082] La mitomicina (también conocida como mutamicina y/o mitomicina C) es un antibiótico aislado del caldo de cultivo de *Streptococcus caespitosus* para el que se ha demostrado una actividad antitumoral. El compuesto es estable al calor, tiene un punto de fusión elevado y es totalmente soluble en disolventes orgánicos.

10 [0083] La mitomicina inhibe selectivamente la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN). El contenido de guanina y citosina se correlaciona con el grado de entrecruzamiento inducido por mitomicina. A altas concentraciones del fármaco se suprime también la síntesis celular del ARN y de las proteínas. La mitomicina se ha usado en tumores de estómago, cérvix, colon, mama, páncreas, vejiga y cabeza y cuello.

15 [0084] En humanos, la mitomicina se elimina rápidamente del suero después de la administración por vía intravenosa. El tiempo requerido para reducir la concentración en suero aproximadamente el 50 % después de una inyección en embolada de 30 mg es de 17 minutos. Después de la inyección I.V. de 30 mg, 20 mg o 10 mg, las concentraciones máximas en el suero fueron de 2,4 mg/ml, 1,7 mg/ml y 0,52 mg/ml, respectivamente. El aclaramiento tiene lugar primariamente por metabolismo en el hígado, pero el metabolismo se produce también en otros órganos. La tasa de aclaramiento es inversamente proporcional a la concentración máxima en el suero, lo que se piensa que es debido a la saturación de las rutas de degradación. Aproximadamente el 10 % de una dosis de mitomicina se excreta inalterada en la orina. Dado que las rutas metabólicas se saturan a dosis relativamente bajas, el porcentaje de una dosis que se excreta en la orina aumenta al aumentar la dosis. En los niños, la excreción de la mitomicina administrada por vía intravenosa es similar.

25 2. Actinomicina D

[0085] La actinomicina D (dactinomicina) [50-76-0]; $C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$ (1.255,43) es un fármaco antineoplásico que inhibe la polimerasa de ARN dependiente de ADN. Con frecuencia es un componente de las combinaciones elegidas principalmente para el tratamiento de enfermedades como, por ejemplo, el coriocarcinoma, el raddomiosarcoma 30 embrionario, tumores testiculares, el sarcoma de Kaposi y el tumor de Wilm. Los tumores que no responden al tratamiento sistémico a veces responden a la perfusión local. La dactinomicina potencia la radioterapia. Es un inmunosupresor secundario (eferente).

[0086] En algunos aspectos específicos, la actinomicina D se usa en combinación con agentes como, por 35 ejemplo, cirugía primaria, radioterapia y otros fármacos, particularmente vincristina y ciclofosfamida. También se ha observado actividad antineoplásica en el tumor de Ewing, el sarcoma de Kaposi y sarcomas de tejidos blandos. La dactinomicina puede ser eficaz en mujeres con casos avanzados de coriocarcinoma. También produce respuestas consistentes en combinación con clorambucilo y metotrexato en pacientes con carcinomas testiculares metastásicos. En ocasiones puede observarse una respuesta en pacientes con la enfermedad de Hodgkin y con linfomas no 40 Hodgkin. La dactinomicina se ha usado también para inhibir respuestas inmunológicas, particularmente el rechazo de trasplantes renales.

[0087] La mitad de la dosis se excreta intacta en la bilis y el 10 % en la orina; la semivida es de 45 aproximadamente 36 horas. El fármaco no atraviesa la barrera hematoencefálica. La actinomicina D se suministra como polvo liofilizado (0,5 mg en cada vial). La dosis diaria normal es de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg; dicha dosis se administra por vía intravenosa durante aproximadamente cinco días; si no se observan manifestaciones de toxicidad, pueden administrarse otros ciclos a intervalos de aproximadamente tres semanas a aproximadamente cuatro semanas. Se han administrado inyecciones diarias de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 400 mg a niños durante aproximadamente diez a aproximadamente catorce días; en 50 otros regímenes se han usado de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 6 mg/kg para un total de 125 mg/kg y dosis semanales de mantenimiento de aproximadamente 7,5 mg/kg. Aunque es más seguro administrar el fármaco en el tubo de una infusión intravenosa, también se han administrado inyecciones intravenosas directas, con la precaución de descartar la aguja usada para extraer el fármaco del vial para evitar reacciones subcutáneas. Las dosis de ejemplo pueden ser de aproximadamente 100 mg/m², aproximadamente 150 mg/m², aproximadamente 175 55 mg/m², aproximadamente 200 mg/m², aproximadamente 225 mg/m², aproximadamente 250 mg/m², aproximadamente 275 mg/m², aproximadamente 300 mg/m², aproximadamente 350 mg/m², aproximadamente 400 mg/m², aproximadamente 425 mg/m², aproximadamente 450 mg/m², aproximadamente 475 mg/m², a aproximadamente 500 mg/m².

60 3. Bleomicina

[0088] La bleomicina es una mezcla de antibióticos glucopeptídicos citotóxicos aislados de una cepa de

Streptomyces verticillus. Aunque el mecanismo de acción exacto de la bleomicina se desconoce, la evidencia disponible parece indicar que el principal modo de acción es la inhibición de la síntesis de ADN con alguna evidencia de una menor inhibición de la síntesis del ARN y las proteínas.

5 [0089] En ratones se encuentran altas concentraciones de bleomicina en la piel, los pulmones, los riñones, el peritoneo y las vías linfáticas. Se ha observado que las células tumorales de la piel y los pulmones tienen altas concentraciones de bleomicina en contraste con las bajas concentraciones encontradas en el tejido hematopoyético. Las bajas concentraciones de bleomicina encontradas en la médula ósea pueden estar relacionadas con los altos niveles de enzimas degradativas de bleomicina encontradas en este tejido.

10 [0090] En los pacientes con un aclaramiento de creatinina superior a aproximadamente 35 ml/min, la semivida de eliminación terminal de bleomicina del suero o el plasma es de aproximadamente 115 minutos. En los pacientes con un aclaramiento de creatinina inferior a aproximadamente 35 ml/min, la semivida de eliminación terminal del suero o el plasma aumenta exponencialmente a medida que disminuye el aclaramiento de creatinina. En humanos, 15 aproximadamente del 60 % a aproximadamente el 70 % de una dosis administrada se recupera en la orina como bleomicina activa. En realizaciones específicas, la bleomicina puede administrarse por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Es totalmente soluble en agua. Debido a la posibilidad de una reacción anafilactoide, los pacientes de linfoma deben tratarse con dos unidades o menos en las primeras dos dosis. Después, si no se produce ninguna reacción aguda, deberá seguirse el programa de dosificación regular.

20 [0091] En aspectos preferidos, la bleomicina debe considerarse como un tratamiento paliativo. Se ha demostrado que es útil en el manejo de los neoplasmas siguientes, tanto como agente único como en combinaciones probadas con otros agentes quimioterapéuticos aprobados en carcinomas de células escamosas como el cáncer de cabeza y cuello (incluyendo boca, lengua, amígdalas, nasofaringe, orofaringe, senos, paladar, 25 labios, mucosa bucal, encías, epiglotis, laringe), de esófago, de pulmón y del tracto genitourinario, la enfermedad de Hodgkin, el linfoma no Hodgkin, el cáncer de piel, de pene, de cérvix y de vulva. También se ha usado en el tratamiento de linfomas y de carcinoma testicular.

[0092] La mejora de la enfermedad de Hodgkin y de los tumores testiculares es rápida y se nota en un plazo 30 de dos semanas. Si no se observa ninguna mejoría en este tiempo, la mejora es improbable. Los cánceres de células escamosas responden más lentamente y en ocasiones requieren hasta tres semanas antes de que se note una mejoría.

IV. Agentes misceláneos

35 [0093] Sobre la base de sus actividades, algunos agentes quimioterapéuticos no se clasifican en las categorías anteriores. Estos incluyen, pero no se limitan a complejos de coordinación de platino, antracenedionas, ureas sustituidas, derivados de metilhidrazina, supresores adrenocorticales, amsacrina, L-asparaginasa y tretinoína. Se considera que se encuentran incluidos en las composiciones y usos de la presente invención para uso en 40 terapias combinadas.

i. Complejos de coordinación de platino

[0094] Los complejos de coordinación de platino incluyen compuestos como carboplatino y cisplatino (cis- 45 DDP). El cisplatino se ha usado ampliamente para el tratamiento de cánceres como, por ejemplo, el carcinoma testicular u ovárico metastásico, el cáncer de vejiga avanzado, el cáncer de cabeza y cuello, el cáncer de pulmón u otros tumores. El cisplatino no se absorbe por vía oral y por lo tanto debe administrarse por otras vías, como por ejemplo, por inyección intravenosa, subcutánea, intratumoral o intraperitoneal. El cisplatino puede usarse solo o en combinación con otros agentes, en lo que en ciertas realizaciones se consideran dosis eficaces usadas en las 50 aplicaciones clínicas de aproximadamente 15 mg/m² a aproximadamente 20 mg/m² durante cinco días cada tres semanas con un total de tres ciclos. Las dosis pueden ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,50 mg/m², aproximadamente 1,0 mg/m², aproximadamente 1,50 mg/m², aproximadamente 1,75 mg/m², aproximadamente 2,0 mg/m², aproximadamente 3,0 mg/m², aproximadamente 4,0 mg/m², aproximadamente 5,0 mg/m² a aproximadamente 10 mg/m².

55 [0095] Los presentes inventores han encontrado que cisplatino, que estimula la producción de ROI, induce los elementos CARG del promotor Egr-1. Por ejemplo, el cisplatino indujo la producción de TNF- α en células cancerosas humanas y de roedor infectadas con un vector de adenovirus que codificaba los elementos CARG del promotor Egr-1 ligados al extremo 5' de un ADNc que codificaba TNF- α . Por lo tanto, la presente invención proporciona una nueva 60 estrategia que combina el uso de agentes quimioterapéuticos que pueden producir ROI o daños en el ADN, como cisplatino, con el control espacial y temporal de la terapia génica con el uso de genes antitumorales.

ii. Otros agentes

[0096] Las antracénodionas, como mitoxantrona, se han usado para el tratamiento de la leucemia granulocítica aguda y el cáncer de mama. Una urea sustituida como la hidroxurea se ha usado en el tratamiento de la leucemia granulocítica crónica, la policitemia verdadera, la trombocitosis esencial y el melanoma maligno. Un derivado de metilhidrazina como procarbazona (*N*-metilhidrazina, MIH) se ha usado en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin. Un supresor adrenocortical como mitotano se ha usado para el tratamiento del cáncer de la corteza adrenal, mientras que la aminoglutetimida se ha usado para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin.

10 V. Dosis

[0097] Las dosis para los agentes que dañan el ADN son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, "Physicians Desk Reference", "The Pharmacological Basis of Therapeutics" de Goodman y Gilman, "Remington's Pharmaceutical Sciences" y "The Merck Index", 11.^a edición, incorporados en este documento por referencia en las partes relevantes) y pueden combinarse con la invención a la luz de lo desvelado en este documento. Necesariamente tendrá lugar alguna variación en la dosificación, dependiendo del estado del sujeto que se trate. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para cada sujeto individual. En este documento se describen también algunos ejemplos de agentes quimioterapéuticos específicos y de regímenes de dosificación. Por supuesto, todas estas dosificaciones y agentes descritos en este documento son ejemplares, más que limitantes y el experto puede usar otras dosis o agentes para un paciente o aplicación específicos. También se espera que cualquier dosis intermedia o intervalo derivable entre estos puntos sea de utilidad en la invención.

C. Genes terapéuticos

25

I. Supresores tumorales

[0098] El gen p53 se reconoce actualmente como un supresor tumoral. Se han encontrado niveles altos de p53 mutante en muchas células transformadas por carcinogénesis química, radiación ultravioleta y varios virus. El gen p53 es una diana frecuente para la inactivación mutacional en una amplia variedad de tumores humanos y ya se ha documentado como el gen mutado con mayor frecuencia en los cánceres humanos comunes. Está mutado en más del 50 % de los cánceres de pulmón no microcíticos (NSCLC) humanos (Hollstein y col., 1991) y en una amplia gama de otros tumores.

[0099] El gen p53 codifica una fosfoproteína de 393 aminoácidos que puede formar complejos con proteínas del huésped como el antígeno T grande de SV40 y E1B de adenovirus. La proteína se encuentra en tejidos y células normales, pero en concentraciones mínimas en comparación con las células transformadas o el tejido tumoral. De manera interesante, el gen p53 natural parece ser importante en la regulación del crecimiento y la división celulares. En algunos casos se ha observado que la expresión en exceso del gen p53 natural tiene un efecto antiproliferativo en líneas de células tumorales humanas. Por lo tanto, p53 puede actuar como un regulador negativo del crecimiento celular (Weinberg, 1991) y puede suprimir directamente el crecimiento celular incontrolado o activar indirectamente genes que suprimen este crecimiento. Por lo tanto, la ausencia o la inactivación del gen p53 natural puede contribuir a la transformación. Sin embargo, algunos estudios indican que la presencia de p53 mutante puede ser necesaria para la expresión total del potencial de transformación del gen.

45

[0100] El gen p53 natural se reconoce como un importante regulador del crecimiento en muchos tipos celulares. Las mutaciones de aminoácido son comunes para el gen p53 y esenciales para la capacidad de transformación del oncogén. Un único cambio genético ocasionado por mutaciones puntuales puede crear un p53 carcinogénico, ya que se sabe que las mutaciones en p53 eliminan la capacidad de supresión tumoral del p53 natural. Sin embargo, a diferencia de otros oncogenes, se sabe que las mutaciones puntuales en p53 tienen lugar en al menos 30 codones diferentes y a menudo se crean alelos dominantes que producen alteraciones del fenotipo celular sin una reducción a homocigosidad. Adicionalmente, muchos de estos alelos negativos dominantes parecen tolerarse en el organismo y transmitirse en la línea germinal. Los diversos alelos mutantes parecen extenderse desde alelos mínimamente disfuncionales hasta alelos dominantes negativos fuertemente penetrantes (Weinberg, 1991).

55

[0101] Casey y colegas han descrito que la transfección del ADN que codifica p53 natural en dos líneas celulares de cáncer de mama humano restablece el control de la supresión del crecimiento en dichas células (Casey y col., 1991). También se ha demostrado un efecto similar en la transfección de p53 natural, pero no del mutante, en líneas celulares de cáncer de pulmón humano (Takashi y col., 1992). El gen p53 parece ser dominante sobre el gen mutante y seleccionará contra la proliferación al transfectarlo en células con el gen mutante. La expresión normal del gen p53 transfectado no afecta al crecimiento de las células normales o no malignas con p53 endógeno. Por lo

60

tanto, estas construcciones pueden introducirse en células normales sin efectos adversos. Por consiguiente se propone que el tratamiento con p53 natural de los cánceres asociados con p53 disminuirá el número de células malignas o su tasa de crecimiento.

5 **[0102]** Las principales transiciones del ciclo celular eucariótico se activan por cinasas dependientes de ciclina o CDK. Una CDK, la cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) regula la progresión a través de la fase G₁. La actividad de esta enzima puede ser la fosforilación de Rb al final de la fase G₁. La actividad de CDK4 está controlada por una subunidad de activación, ciclina del tipo D, y por una subunidad inhibidora, p16^{INK4}. La subunidad p16^{INK4} se ha caracterizado bioquímicamente como una proteína que se une específicamente e inhibe a CDK4 y, por lo tanto,
10 puede regular la fosforilación de Rb (Serrano y col., 1993; Serrano y col., 1995). Dado que la proteína p16^{INK4} es un inhibidor de CDK4 (Serrano, 1993), la delección de este gen puede aumentar la actividad de CDK4, lo que resulta en la hiperfosforilación de la proteína Rb. También se sabe que p16 regula la actividad de CDK6.

[0103] La proteína p16^{INK4} pertenece a una clase nuevamente descrita de proteínas inhibidoras de CDK que
15 también incluye p15^{INK4B}, p21^{WAF1} y p27^{KIP1}. El gen p16^{INK4} se localiza en 9p21, una región cromosómica deletada frecuentemente en muchos tipos de tumores. Las delecciones y las mutaciones homocigóticas del gen p16^{INK4} son frecuentes en las líneas de células tumorales humanas. Esta evidencia sugiere que el gen p16^{INK4} es un gen supresor tumoral. Sin embargo, esta interpretación ha sido cuestionada por la observación de que la frecuencia de alteraciones del gen p16^{INK4} es mucho menor en tumores primarios no cultivados que en líneas celulares cultivadas
20 (Caldas y col., 1994; Cheng y col., 1994; Hussussian y col., 1994; Kamb y col., 1994; Kamb y col., 1994; Mori y col., 1994; Okamoto y col., 1994; Nobori y col., 1995; Orlow y col., 1994; Arap y col., 1995). Sin embargo, posteriormente se demostró que mientras que el gen p16 estaba intacto en muchos tumores primarios, había otros mecanismos que impedían la expresión de la proteína p16 en un elevado porcentaje de algunos tipos de tumores. Uno de estos mecanismos es la hipermetilación del promotor de p16 (Merlo y col., 1995; Herman, 1995; González-Zulueta, 1995).
25 El restablecimiento de la actividad de p16^{INK4} natural por transfección con un vector de expresión plasmídico redujo la formación de colonias en algunas líneas de células cancerosas humanas (Okamoto, 1994; Arap, 1995): La administración de p16 con vectores de adenovirus inhibe la proliferación de algunas líneas cancerosas humanas y reduce el crecimiento de xenoinjertos tumorales humanos.

30 **[0104]** C-CAM se expresa prácticamente en todas las células epiteliales (Odin y Obrink, 1987). C-CAM, con un peso molecular aparente de 105 kDa, se aisló originalmente de la membrana plasmática del hepatocito de rata por su reacción con anticuerpos específicos que neutralizan la agregación celular (Obrink, 1991). Algunos estudios recientes indican que, estructuralmente, C-CAM pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y su secuencia presenta gran homología con la del antígeno carcinoembrionario (CEA) (Lin y Guidotti, 1989). Mediante
35 un sistema de expresión de baculovirus, Cheung y col., (1993) han demostrado que el primer dominio Ig de C-CAM es crítico para la actividad de adhesión celular.

[0105] Se sabe que las moléculas de adhesión celular o CAM están implicadas en una red compleja de interacciones moleculares que regulan el desarrollo de los órganos y la diferenciación celular (Edelman, 1985).
40 Algunos datos recientes indican que la expresión aberrante de las CAM puede estar implicada en la tumorigénesis de varios neoplasmas; por ejemplo, la disminución de la expresión de E-cadherina, que se expresa predominantemente en células epiteliales, se asocia con la progresión de varios tipos de neoplasmas (Edelman y Crossin, 1991; Frixen y col., 1991; Bussemakers y col., 1992; Matsura y col., 1992; Umbas y col., 1992). Además, Giancotti y Ruoslati (1990) han demostrado que el aumento de la expresión de la integrina $\alpha_5\beta_1$ por transferencia
45 génica puede reducir la tumorigenicidad de células de ovario de hámster chino *in vivo*. Ahora se ha demostrado que C-CAM suprime el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo*.

[0106] Otros supresores tumorales que pueden emplearse de acuerdo con la presente invención incluyen p21, p15, BRCA1, BRCA2, IRF-1, PTEN, RB, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, zac1, p73, VHL, FCC, MCC,
50 DBCCR1, DCP4 y p57.

II. Inductores de apoptosis

[0107] De manera similar, los inductores de apoptosis como Bax, Bak, Bcl-Xg, Bad, Bim, Bik, Bid, Harakiri,
55 AdE1B, Bad, proteasas ICE-CED3, TRAIL, SARP-2 y apoptina podrían usarse de acuerdo con la presente invención. Además, la administración y la expresión regulada de genes citotóxicos se han descrito en la solicitud de patente de los EE. UU. con el título "Induction of Apoptotic or Cytotoxic Gene Expression by Adenoviral Mediated Gene Codelivery", presentada el 11 de marzo de 1999 (incorporada específicamente en este documento por referencia).

60 III. Enzimas

[0108] Diversos genes enzimáticos son de interés de acuerdo con la presente invención. Estas enzimas

incluyen citosina-desaminasa, adenosina-desaminasa, hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa y timidina-cinasa humana.

IV. Citocinas, hormonas y factores de crecimiento

5

[0109] Otra clase de genes para los que se considera su inserción en los vectores de la presente invención incluyen interleucinas y citocinas. Interleucina 1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, interferón β , interferón α , interferón γ , angiostatina, trombospondina, endostatina, METH-1, METH-2, GM-CSF, G-CSF, M-CSF y el factor de necrosis tumoral (TNF).

10

[0110] TNF- α es una citocina segregada por ~~macrófagos~~ ^{macrófagos} y otras células hematopoyéticas que muestra actividad antitumoral en estudios en animales (Old, 1985; Fiers, 1991). TNF- α es citotóxico para muchas células malignas y también desempeña un papel importante en la defensa contra infecciones víricas, bacterianas y parasitarias y en respuestas autoinmunitarias (Fiers, 1991). Un efecto citotóxico directo sobre las células tumorales, así como efectos citotóxicos y trombocíticos sobre la vasculatura tumoral son responsables de los efectos antitumorales de TNF- α (Watanabe y col., 1988; Tartaglia y col., 1993; Robaye y col., 1991; Havell y col., 1988; Obrador y col., 2001; Slungaard y col., 1990; Mauceri y col., 2002). La combinación de TNF- α con agentes quimioterapéuticos como cisplatino y adriamicina que dañan el ADN ha demostrado tener efectos sinérgicos en modelos experimentales (Duan y col., 2001; Bonavida y col., 1990). Recientemente, se ha descrito que la perfusión aislada de extremidades con melfalán, un agente alquilante bifuncional, y TNF- α es una estrategia terapéutica de éxito para sarcomas y melanomas de las extremidades (Thom y col., 1995). Sin embargo, la toxicidad sistémica ha limitado el uso de TNF- α en la terapia del cáncer humano (Spriggs y col., 1988).

15

20

[0111] La presente invención proporciona la quimioinducción de TNF- α bajo el control del promotor inducible Egr-1, que puede ser inducido por ROI, daños en el ADN e IR, por un agente quimioterapéutico de acuerdo con la reivindicación 1. Los estudios en modelos de cáncer de ratón y en células cancerosas humanas han demostrado que la quimioinducción de TNF- α en sí misma no causa ninguna toxicidad.

25

V. Toxinas

30

[0112] También se han considerado útiles diversas toxinas como parte de los vectores de expresión de la presente invención. Estas toxinas incluyen toxinas bacterianas como la cadena A de la ricina (Burbage, 1997), la toxina A de la difteria (Massuda y col., 1997; Lidor, 1997), la subunidad A de la toxina pertúsica, la subunidad A de la enterotoxina de *E. coli*, la subunidad A de la toxina del cólera y la parte C-terminal de la toxina de *Pseudomonas*. Recientemente se ha demostrado que la transfección de un plásmido que contenía el gen de la cadena A de la toxina de la difteria regulable por proteínas de fusión era citotóxica para las células cancerosas. Por lo tanto, la transferencia génica de genes de toxinas regulados puede aplicarse también al tratamiento de cánceres (Massuda y col., 1997).

35

40 VI. Construcciones antisentido

[0113] La metodología antisentido aprovecha el hecho de que los ácidos nucleicos tienden a aparearse con secuencias "complementarias". Por complementarios quieren indicarse los polinucleótidos que son capaces de un apareamiento de bases de acuerdo con las reglas estándar de complementariedad de Watson y Crick. Es decir las purinas de mayor tamaño se aparean con las pirimidinas de menor tamaño para formar combinaciones de guanina apareada con citosina (G: C) y de adenina apareada con timina (A: T), en el caso de ADN, o de adenina apareada con uracilo (A: U), en el caso de ARN. La inclusión de bases menos comunes como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras en las secuencias de hibridación no interfiere con el apareamiento.

45

[0114] El reconocimiento del ADN bicatenario (ds) como diana por polinucleótidos conduce a la formación de hélices triples; el reconocimiento del ARN como diana conduce a la formación de hélices dobles. Cuando se introducen polinucleótidos antisentido en una célula diana, se unen específicamente a su polinucleótido diana e interfieren con la transcripción, el procesamiento de ARN, el transporte, la traducción y/o la estabilidad. Las construcciones antisentido de ARN o el ADN que codifica estos ARN antisentido pueden emplearse para inhibir la transcripción o la traducción génicas o ambas tanto dentro de una célula huésped, *in vitro* o *in vivo*, como dentro de un animal huésped, incluido un sujeto humano.

50

55

[0115] Las construcciones antisentido pueden diseñarse para su unión al promotor y a otras regiones de control, exones, intrones o incluso los bordes exón-intrón de un gen. Se considera que las construcciones antisentido más eficaces incluirán regiones complementarias a las uniones de corte y empalme intrón-exón. Por lo tanto, se propone que una realización preferida incluye una construcción antisentido con complementariedad con regiones situadas en un espacio de 50-200 bases de una unión de corte y empalme intrón-exón. Se ha observado

60

que es posible incluir algunas secuencias del exón en la construcción sin afectar gravemente a la selectividad de esta para la diana. La cantidad de material exónico incluido puede variar, dependiendo de las secuencias particulares de exón e intrón usadas. Es posible comprobar fácilmente si se ha incluido demasiado ADN exónico, simplemente probando las construcciones *in vitro* para determinar si la actividad celular normal o la expresión de genes relacionados que tienen secuencias complementarias quedan afectadas.

[0116] Según se ha expuesto anteriormente, “complementarias” o “antisentido” indican secuencias polinucleotídicas que son sustancialmente complementarias en toda su longitud y tienen muy pocos apareamientos de bases erróneos. Por ejemplo, unas secuencias de quince bases de longitud pueden denominarse complementarias cuando tienen nucleótidos complementarios en trece o catorce posiciones. Naturalmente, las secuencias que son completamente complementarias serán las secuencias que son totalmente complementarias en toda su longitud y no tienen apareamientos de bases erróneos. También se consideran otras secuencias con menores grados de homología. Por ejemplo, podría diseñarse una construcción antisentido con regiones limitadas de gran homología, pero que también contuviera una región no homóloga (p. ej., ribozima; véase más adelante). Estas moléculas, aunque tienen menos del 50 % de homología, se unirían a las secuencias diana en las condiciones apropiadas.

[0117] Puede ser ventajoso combinar porciones de ADN genómico con ADNc o secuencias sintéticas para generar construcciones específicas. Por ejemplo, si se desea un intrón en la construcción final, se necesitará usar un clon genómico. El ADNc o un polinucleótido sintetizado pueden proporcionar sitios de restricción más convenientes para la porción restante de la construcción y, por tanto, se usarán para el resto de la secuencia.

[0118] Algunos oncogenes particulares que son dianas para construcciones antisentido son *ras*, *myc*, *neu*, *raf*, *erb*, *src*, *fms*, *jun*, *trk*, *ret*, *hst*, *gsp*, *bcl-2* y *abl*. También se consideran útiles los genes antiapoptóticos y los promotores de angiogénesis.

VII. Ribozimas

[0119] Aunque tradicionalmente se han usado proteínas para la catálisis de los ácidos nucleicos, ha surgido otra clase de macromoléculas de la misma utilidad para este cometido. Las ribozimas son complejos de ARN y proteína que escinden los ácidos nucleicos de manera específica del sitio. Las ribozimas tienen dominios catalíticos específicos con actividad endonucleasa (Kim y Cook, 1987; Gerlach y col., 1987; Forster y Symons, 1987). Por ejemplo, un gran número de ribozimas aceleran las reacciones de transferencia de fosfoéster con un alto grado de especificidad, escindiendo a menudo solamente uno de varios ésteres fosfóricos en un sustrato oligonucleotídico (Michel y Westhof, 1990; Reinhold-Hurek y Shub, 1992). Esta especificidad se ha atribuido al requerimiento de que el sustrato se una por medio de interacciones de apareamiento de bases específicas a la secuencia guía interna (“IGS”) de la ribozima antes de la reacción química.

[0120] La catálisis por ribozimas se ha observado primariamente como parte de las reacciones de escisión/ligación específicas de la secuencia en las que intervienen ácidos nucleicos (Joyce, 1989; Cook y col., 1981). Por ejemplo, la patente de los EE. UU. 5.354.855 describe que ciertas ribozimas pueden actuar como endonucleasas con una especificidad de secuencia superior a la de las ribonucleasas conocidas y próxima a la de las enzimas de restricción de ADN. Por lo tanto, la inhibición de la expresión génica mediada por ribozimas y específica de la secuencia puede ser especialmente adecuada para aplicaciones terapéuticas (Scanlon y col., 1991; Sarver y col., 1990). Recientemente se ha descrito que ribozimas provocaron cambios genéticos en algunas líneas celulares a las que se habían administrado; los genes alterados incluyeron los oncogenes H-ras, c-fos y genes del VIH. La mayor parte de este trabajo implicó la modificación de un ARNm diana, sobre la base de un codón mutante específico escindido por una ribozima específica. Las dianas para esta realización incluirán genes angiogénicos como los VEGF y angiopoyetinas, así como oncogenes (p. ej., *ras*, *myc*, *neu*, *raf*, *erb*, *src*, *fms*, *jun*, *trk*, *ret*, *hst*, *gsp*, *bcl-2*, *EGFR*, *grb2* y *abl*).

VIII. Anticuerpos de cadena sencilla

[0121] En otra realización más, un gen puede comprender un anticuerpo de cadena sencilla. Los procedimientos para la producción de anticuerpos de cadena sencilla son bien conocidos por los expertos en la técnica. El experto puede referirse a la patente de los EE.UU. 5.359.046 para estos procedimientos. Un anticuerpo de cadena sencilla se crea por la fusión conjunta de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera mediante un péptido enlazante de poca longitud, lo que reconstituye un sitio de unión al antígeno en una sola molécula.

[0122] Se han desarrollado fragmentos variables de anticuerpos de cadena sencilla (scFv) en los que el extremo C de un dominio variable se une al extremo N del otro por medio de un péptido o enlazante de 15 a 25 aminoácidos, sin que se altere significativamente la unión del antígeno o la especificidad de la unión (Bedzyk y col.,

1990; Chaudhary y col., 1990). Estos Fv carecen de las regiones constantes (Fc) presentes en las cadenas pesada y ligera del anticuerpo nativo.

[0123] Se consideran anticuerpos dirigidos contra una amplia diversidad de moléculas, como oncogenes, factores de crecimiento, hormonas, enzimas, factores de transcripción o receptores. También se contemplan anticuerpos segregados, dirigidos específicamente al suero, contra factores angiogénicos (VBGF/VSP; FGF- β ; FGF- α) y antígenos endoteliales necesarios para la angiogénesis (es decir, integrina V3). Se consideran específicamente factores de crecimiento como el factor de crecimiento de transformación y el factor de crecimiento derivado de plaquetas.

10

IX. Reguladores del ciclo celular

[0124] Los reguladores del ciclo celular ofrecen posibles ventajas cuando se combinan con otros genes. Estos reguladores del ciclo celular incluyen p27, p21, p57, p18, p73, p19, p15, E2F-1, E2F-2, E2F-3, p107, p130 y E2F-4.

15 Otros reguladores del ciclo celular incluyen proteínas antiangiogénicas, como Flt1 soluble (receptor VEGF soluble dominante negativo), receptores Wnt solubles, el receptor Tie2/Tek soluble, el dominio hemopexina soluble de la metaloproteasa 2 de la matriz y receptores solubles de otras citocinas angiogénicas (p. ej., VEGFR1/KDR, VEGFR3/F1t4, ambos receptores de VEGF).

20 X. Quimiocinas

[0125] En la presente invención pueden usarse también genes que codifican quimiocinas. Las quimiocinas actúan generalmente como quimioatrayentes para atraer células efectoras inmunitarias al sitio de la expresión de la quimiocina. Puede ser ventajoso expresar un gen de quimiocina particular en combinación con, por ejemplo, un gen de citocina para aumentar la atracción de otros componentes del sistema inmunitario al sitio del tratamiento. Estas quimiocinas incluyen RANTES, MCAF, MIP1- α , MIP1- β e IP-10. El experto reconocerá que se sabe que ciertas citocinas tienen también efectos quimioatrayentes y podrían clasificarse además como quimiocinas.

25

D. Construcciones de expresión

30

I. Vectores

[0126] El término "vector" se usa para referirse a una molécula portadora de ácido nucleico en la cual puede insertarse una secuencia de ácido nucleico para su introducción en una célula en la que puede replicarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es extraña a la célula en la que se introduce el vector o que la secuencia es homóloga a una secuencia de la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en la que la secuencia no se encuentra normalmente. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus de animales y virus de plantas) y cromosomas artificiales (p. ej. YAC). Un experto en la técnica estará bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándar (véanse, por ejemplo, Goodbourn y Maniatis y col., 1988 y Ausubel y col., 1994, ambas publicaciones incorporadas en este documento por referencia).

35

40

[0127] El término "vector de expresión" se refiere a cualquier tipo de construcción genética que comprende un ácido nucleico que codifica un ARN capaz transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen después para dar una proteína, un polipéptido o un péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener diversas "secuencias de control", que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posible traducción de una secuencia codificante ligada operativamente en una célula huésped particular. De acuerdo con la presente invención, los vectores contendrán suficientes porciones del promotor Egr-1 para conferir inducibilidad química. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y la translación, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que tienen también otras funciones y que se describen más adelante.

45

50

i. Señales de iniciación y sitios internos de unión a ribosomas

55

[0128] Para una traducción eficaz de las secuencias codificantes puede requerirse también una señal de iniciación específica. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG o secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales de control traduccional exógenas, incluido el codón de iniciación ATG. Un experto en la técnica será fácilmente capaz de determinar esto y de proporcionar las señales necesarias. Es bien sabido que el codón de iniciación debe estar "en fase" con la fase de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Las señales de control traduccional exógenas y los codones de iniciación pueden ser naturales o sintéticos. La eficiencia de la expresión puede aumentarse por la inclusión de los elementos

60

potenciadores de la transcripción apropiados.

[0129] En ciertas realizaciones de la invención, se usan de sitios internos de unión a ribosomas (IRES) para crear mensajes multigénicos o policistrónicos. Los elementos IRES son capaces de eludir el modelo de barrido del ribosoma de traducción dependiente de una caperuza metilada en el extremo 5' y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito los elementos IRES de dos miembros de la familia de picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como un elemento IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos IRES pueden ligarse a fases abiertas de lectura heterólogas. Múltiples fases de lectura pueden transcribirse conjuntamente, cada una separada por un elemento IRES, con lo que se crean mensajes policistrónicos. Gracias al elemento IRES, cada fase de lectura abierta es accesible a los ribosomas para una traducción eficiente. Es posible expresar múltiples genes eficientemente mediante un único promotor/potenciador para transcribir un solo mensaje (véanse las patentes de los EE. UU. n^{os} 5.925.565 y 5.935.819).

15 ii. Sitios de clonación múltiple

[0130] Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios para enzimas de restricción, cualquiera de los cuales puede usarse junto con la tecnología recombinante estándar para digerir el vector (véanse, por ejemplo, Carbonelli y col., 1999; Levenson y col., 1998; Cocea, 1997). La "digestión con enzimas de restricción" se refiere a la escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que actúa solamente en puntos específicos en una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están disponibles comercialmente. Los expertos en la técnica comprenden ampliamente el uso de estas enzimas. Frecuentemente, un vector se linealiza o fragmenta mediante una enzima de restricción que corta dentro del MCS para permitir la ligación de secuencias exógenas a dicho vector. La "ligación" se refiere al proceso de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden o no ser contiguos entre sí. Las técnicas que implican enzimas de restricción y reacciones de ligación son bien conocidas por los expertos en la tecnología recombinante.

30 iii. Sitios de corte y empalme

[0131] La mayoría de las moléculas transcritas de ARN eucariótico sufren un corte y empalme del ARN para eliminar los intrones de los transcritos primarios. Los vectores que contienen secuencias genómicas eucarióticas pueden requerir sitios de corte y empalme donadores y/o aceptores para asegurar el procesamiento correcto del transcrito para la expresión de la proteína (véase, por ejemplo, Chandler y col., 1997).

35 iv. Señales de terminación

[0132] Generalmente, los vectores o las construcciones de la presente invención comprenderán al menos una señal de terminación. Una "señal de terminación" o "terminador" está comprendida por las secuencias de ADN implicadas en la terminación específica de un transcrito de ARN por la ARN-polimerasa. Por lo tanto, en ciertas realizaciones se considera una señal de terminación que finaliza la producción de un transcrito de ARN. Un terminador puede ser necesario *in vivo* para alcanzar los niveles deseables del mensaje.

[0133] En los sistemas eucarióticos, la región terminadora puede comprender también secuencias de ADN específicas que permiten la escisión específica del sitio del nuevo transcrito de manera que se exponga un sitio de poliadenilación. Este sirve de señal a una polimerasa endógena especializada para añadir un tramo de aproximadamente 200 restos A (poliA) al extremo 3' del transcrito. Las moléculas de ARN modificadas con esta cola de poliA parecen ser más estables y se traducen con mayor eficiencia. Por lo tanto, en otras realizaciones en las que intervienen eucariotas se prefiere que el terminador comprenda una señal para la escisión del ARN y se prefiere más que la señal de terminación estimule la poliadenilación del mensaje. El terminador y/o el sitio de poliadenilación pueden servir para aumentar los niveles de mensaje y para minimizar la lectura desde la casete en otras secuencias.

[0134] Los terminadores considerados para uso en la invención incluyen cualquier terminador de transcripción descrito en este documento o conocido por el experto en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, las secuencias de terminación de genes como, por ejemplo, el terminador de la hormona de crecimiento bovina o secuencias de terminación víricas como, por ejemplo, el terminador de SV40. En algunas realizaciones, la señal de terminación puede ser la falta de una secuencia transcribible o traducible, por ejemplo a causa de un truncamiento de la secuencia.

60 v. Señales de poliadenilación

[0135] En la expresión, en particular en la expresión eucariótica, típicamente se incluirá una señal de

poliadenilación para lograr la poliadenilación correcta del transcrito. No se piensa que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica satisfactoria de la invención y puede emplearse cualquier secuencia. Las realizaciones preferidas incluyen la señal de poliadenilación de SV40 o la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina, conveniente y que se sabe que funciona bien en varias células diana. La poliadenilación puede aumentar la estabilidad del transcrito o facilitar el transporte citoplásmico.

vi. Orígenes de replicación

[0136] Con el fin de propagar un vector en una célula huésped, este puede contener uno o más sitios de origen de replicación (frecuentemente denominados "ori"), que son secuencias de ácido nucleico específicas en las que se inicia la replicación. Alternativamente, puede emplearse una secuencia de replicación autónoma (ARS) si la célula huésped es una levadura.

vii. Marcadores seleccionables y analizables

[0137] En ciertas realizaciones de la invención, las células que contienen una construcción de ácido nucleico de la presente invención pueden identificarse *in vitro* o *in vivo* mediante la inclusión de un marcador en el vector de expresión. Estos marcadores confieren un cambio identificable a la célula que permite la fácil identificación de las células que contienen el vector de expresión. Generalmente, un marcador seleccionable es un marcador que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador de selección positiva es un marcador cuya presencia permite su selección, mientras que un marcador de selección negativa es uno cuya presencia evita su selección. Un ejemplo de un marcador de selección positiva es un marcador de resistencia a un fármaco.

[0138] Normalmente, la inclusión de un marcador de selección por un fármaco ayuda a la clonación y a la identificación de los transformantes, por ejemplo, los genes que confieren resistencia a neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores seleccionables útiles. Además de los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de los transformantes mediante la implementación de determinadas condiciones, también se consideran otros tipos de marcadores, incluyendo marcadores analizables como GFP, que se basan en el análisis colorimétrico. Alternativamente, pueden usarse enzimas analizables como la timidina-cinasa (tk) del virus del herpes simple o la cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT). El experto en la técnica sabrá también cómo emplear marcadores inmunológicos, posiblemente en combinación con un análisis de FACS. No se piensa que el marcador usado sea importante, siempre y cuando sea capaz de expresarse simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. El experto en la técnica conoce otros ejemplos adicionales de marcadores seleccionables y analizables.

viii. Vectores plasmídicos

[0139] En algunas realizaciones se considera un vector plasmídico para su uso en la transformación de una célula huésped. En general, se usan vectores plasmídicos que contienen replicones y secuencias de control derivados de especies compatibles con la célula huésped en conexión con estos huéspedes. Normalmente, el vector contiene un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar una selección fenotípica en las células transformadas. En un ejemplo no limitante, *E. coli* se transforma frecuentemente mediante derivados de pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. El plásmido pBR322 contiene genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina y por lo tanto proporciona una manera fácil de identificar las células transformadas. El plásmido pBR u otro plásmido microbiano o fago deben contener también o modificarse para contener, por ejemplo, promotores que puedan ser usados por el organismo microbiano para la expresión de sus propias proteínas.

[0140] Además, es posible usar vectores fágicos que contienen replicones y secuencias de control que son compatibles con el microorganismo huésped como vectores de transformación en conexión con estos huéspedes. Por ejemplo, el fago λ GEMTM-11 puede usarse para preparar un vector fágico recombinante que puede usarse para transformar células huésped, por ejemplo, *E. coli* LE392.

[0141] Otros vectores plasmídicos útiles incluyen los vectores pIN (Inouye y col., 1985) y los vectores pGEX para uso en la generación de proteínas de fusión solubles de glutatión-S-transferasa (GST) para su posterior purificación y separación o escisión. Otras proteínas de fusión adecuadas son aquellas con -galactosidasa, ubiquitina y similares.

[0142] Las células huésped bacterianas, por ejemplo *E. coli*, que comprenden el vector de expresión se cultivan en cualquiera de una serie de medios adecuados, por ejemplo LB. En ciertos vectores puede inducirse la expresión de la proteína recombinante, como entenderán los expertos en la técnica, mediante la puesta en contacto de la célula huésped con un agente específico para ciertos promotores, p. ej. mediante la adición de IPTG al medio o

pasando a incubar a una temperatura más alta. Después de cultivar las bacterias durante un tiempo adicional, generalmente de entre 2 y 24 h, las células se recogen por centrifugación y se lavan para eliminar el medio residual.

ix. Vectores víricos

5

[0143] La capacidad de ciertos virus de infectar células o de penetrar en células por medio de endocitosis mediada por receptores y de integrarse en el genoma de la célula huésped y expresar los genes víricos de manera estable y eficiente, los ha convertido en candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos extraños a células (p. ej. células de mamíferos). A continuación se describen ejemplos no limitantes de vectores víricos que pueden usarse para administrar un ácido nucleico de la presente invención.

10

a. Vectores adenovíricos

[0144] Un procedimiento particular para la administración del ácido nucleico implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. Aunque se sabe que los vectores de adenovirus tienen una baja capacidad de integración en el ADN genómico, esta característica queda contrarrestada por la alta eficiencia de la transferencia génica conseguida con estos vectores. En los "vectores de expresión de adenovirus" se pretende incluir aquellas construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes para (a) sustentar el empaquetamiento de la construcción y (b) finalmente expresar una construcción específica de tejidos o células que se haya clonado en estos. El conocimiento de la organización genética del adenovirus, un virus de ADN bicatenario lineal de 36 kb, permite la sustitución de grandes fragmentos del ADN adenovírico por secuencias extrañas de hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, 1992).

15

20

b. Vectores de VAA

25

[0145] El ácido nucleico puede introducirse en la célula mediante transfección asistida por adenovirus. Se han descrito eficiencias de transfección aumentadas en sistemas celulares con el uso de sistemas acoplados a adenovirus (Kelleher y Vos, 1994; Cotten y col., 1992; Curiel, 1994). El virus adenoasociado (VAA) es un sistema vector atractivo para uso de acuerdo con la presente invención ya que tiene una alta frecuencia de integración y puede infectar a células que no se dividen, lo que lo hace útil para la administración de genes a células de mamíferos, por ejemplo en cultivo de tejidos (Muzyczka, 1992) o *in vivo*. El VAA tiene una amplia gama de huéspedes en cuanto a infectividad (Tratschin y col., 1984; Laughlin y col., 1986; Lebkowski y col., 1988; McLaughlin y col., 1988). Los detalles referentes a la generación y el uso de vectores de VAA se describen en las patentes de los EE. UU. 5.139.941 y 4.797.368.

30

35

c. Vectores retrovíricos

[0146] Los retrovirus son prometedores como vectores para la administración de genes debido a su capacidad de integrar sus genes en el genoma del huésped y transferir una gran cantidad de material genético extraño, infectar una amplia gama de especies y de tipos celulares y empaquetarse en líneas celulares especiales (Miller, 1992).

40

[0147] Con el fin de construir un vector retrovívico, se inserta un ácido nucleico en el genoma vírico en el lugar de ciertas secuencias víricas para producir un virus defectivo en cuanto a la replicación. Para producir viriones se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes *gag*, *pol* y *env*, pero sin las LTR ni los componentes de empaquetamiento (Mann y col., 1983). Cuando un plásmido recombinante que contiene un ADNc junto con las LTR retrovíricas y las secuencias de empaquetamiento se introduce en una línea celular especial (p. ej., por precipitación con fosfato de calcio), las secuencias de empaquetamiento permiten el empaquetamiento del transcrito de ARN del plásmido recombinante en partículas víricas que se secretan después al medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann y col., 1983). A continuación, el medio que contiene los retrovirus recombinantes se recoge, opcionalmente se concentra y se usa para la transferencia génica. Los vectores retrovíricos pueden infectar una amplia variedad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y la expresión estable requieren la división de las células huésped (Paskind y col., 1975).

45

50

[0148] Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de los genes retrovíricos comunes *gag*, *pol* y *env*, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Los vectores de lentivirus son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Naldini y col., 1996; Zufferey y col., 1997; Blomer y col., 1997; las patentes de los EE. UU. 6.013.516 y 5.994.136). Algunos ejemplos de lentivirus incluyen los virus de la inmunodeficiencia humana, VIH-1 y VIH-2 y el virus de la inmunodeficiencia simia, VIS. Los vectores de lentivirus se han generado mediante atenuación múltiple de los genes de virulencia del VIH; por ejemplo se eliminan los genes *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* para hacer al vector biológicamente seguro.

55

60

[0149] Los vectores recombinantes de lentivirus son capaces de infectar células que no se dividen y pueden

usarse tanto *in vivo* como *ex vivo* para la transferencia génica y la expresión de secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, un lentivirus recombinante capaz de infectar una célula que no se divide, en que un huésped celular adecuado se transfecta con dos o más vectores que contienen las funciones de empaquetamiento, es decir, *gag*, *pol* y *env*, así como *rev* y *tat*, se describe en la patente de los EE. UU. n° 5.994.136. El posible dirigir específicamente el virus recombinante por acoplamiento de la proteína de la envuelta con un anticuerpo o un ligando particular para el reconocimiento específico de un receptor o un tipo celular particular. Al insertar una secuencia de interés (incluida una proteína reguladora) en el vector vírico junto con otro gen que codifica el ligando para un receptor en una célula diana específica, por ejemplo, el vector es ahora específico para la diana.

10 d. Otros vectores víricos

[0150] Otros vectores víricos pueden emplearse como construcciones de vacuna en la presente invención. Pueden emplearse vectores derivados de virus como el virus de la vacuna (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar y col., 1988), el virus Sindbis, citomegalovirus y el virus del herpes simple. Estos virus ofrecen varias características atractivas para diversas células de mamíferos (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar y col., 1988; Horwich y col., 1990).

e. Administración mediante virus modificados

[0151] Un ácido nucleico que ha de ser administrado puede alojarse dentro de un vector infectivo que ha sido manipulado para expresar un ligando de unión específico. De este modo, la partícula del virus se une específicamente a los receptores afines de la célula diana y administra su contenido a la célula. Se ha desarrollado una nueva estrategia diseñada para permitir el direccionamiento específico de vectores de retrovirus basada en la modificación química de un retrovirus por la adición química de restos de lactosa a la envuelta del virus. Esta modificación puede permitir la infección específica de hepatocitos por medio de los receptores de sialoglicoproteínas.

[0152] Se ha diseñado otra estrategia para el direccionamiento de retrovirus recombinantes en la que se usaron anticuerpos biotinilados dirigidos contra una proteína de la envuelta del retrovirus y contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron a través de los componentes de biotina con el uso de estreptavidina (Roux y col., 1989). Mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra antígenos de clase I y de clase II del complejo principal de histocompatibilidad, los autores demostraron la infección de diversas células humanas que portaban estos antígenos de superficie con un virus ecotrópico *in vitro* (Roux y col., 1989).

35 II. Administración del vector y transformación celular

[0153] Se piensa que los procedimientos adecuados para la administración de un ácido nucleico para la transformación de un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo para usar con la presente invención incluyen prácticamente cualquier procedimiento por el que un ácido nucleico (p. ej., ADN) puede introducirse en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, según se describen en este documento o como conocerán los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a la administración directa de ADN por ejemplo por transfección *ex vivo* (Wilson y col., 1989; Nabel y col., 1989); por inyección (patentes de los EE. UU. 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859), incluyendo la microinyección (Harlan y Weintraub, 1985; patente de los EE. UU. n° 5.789.215); por electroporación (patente de los EE. UU. n° 5.384.253; Tur-Kaspa y col., 1986; Potter y col., 1984); por precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y col., 1990); mediante el uso de DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga directa por ultrasonidos (Fechheimer y col., 1987); por transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y col., 1979; Nicolau y col., 1987; Wong y col., 1980; Kaneda y col., 1989; Kato y col., 1991) y por transfección mediada por receptores (Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988); por bombardeo con microproyectiles (solicitudes PCT n°s WO 94/09699 y 95/06128; patentes de los EE. UU. 5.610.042, 5.322.783, 5.563.055, 5.550.318, 5.538.877 y 5.538.880); por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaepler y col., 1990; patentes de los EE. UU. 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (patentes de los EE. UU. 5.591.616 y 5.563.055); por transformación de protoplastos mediada por PEG (Omirlulleh y col., 1993; patente de los EE. UU. 4.684.611 y 4.952.500); por absorción de ADN mediada por desecación/imbibición (Potrykus y col., 1985) y cualquier combinación de estos procedimientos. Mediante la aplicación de técnicas como estas es posible transformar un orgánulo(s), una célula(s), un tejido(s) o un organismo(s) de manera estable o transitoria.

i. Transformación *ex vivo*

[0154] Los procedimientos para la transfección de células y tejidos vasculares extirpados de un organismo en una preparación *ex vivo* son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se han alterado genéticamente

células endoteliales caninas por transferencia génica con retrovirus *in vitro* y trasplantado a un animal canino (Wilson y col., 1989). En otro ejemplo, se transfectaron células endoteliales de cerdo enano del Yucatán con retrovirus *in vitro* y se trasplantaron en una arteria mediante un catéter de doble balón (Nabel y col., 1989). Por lo tanto, se considera que pueden extirparse células o tejidos y transfectarse *ex vivo* con los ácidos nucleicos de la presente invención. En aspectos particulares, las células o los tejidos trasplantados pueden colocarse en un organismo. En facetas preferidas, se expresa un ácido nucleico en las células o tejidos trasplantados.

ii. Inyección

10 **[0155]** En ciertas realizaciones, puede administrarse un ácido nucleico a un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo por medio de una o más inyecciones (es decir, una inyección con aguja), por ejemplo por vía subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, etc. Los procedimientos de inyección de vacunas son bien conocidos por los expertos en la técnica (p. ej., la inyección de una composición que comprende una disolución salina). Otras realizaciones de la presente invención incluyen la introducción de un ácido nucleico por
15 microinyección directa. La microinyección directa se ha usado para introducir construcciones de ácido nucleico en ovocitos de *Xenopus* (Harland y Weintraub, 1985).

iii. Electroporación

20 **[0156]** En ciertas realizaciones de la presente invención se introduce un ácido nucleico en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo por medio de electroporación. La electroporación implica la exposición de una suspensión de células y ADN a una descarga eléctrica de alta tensión. En algunas variantes de este procedimiento, se emplean ciertas enzimas de degradación de la pared celular, como enzimas que degradan pectina, para hacer las células receptoras diana más susceptibles a la transformación por electroporación que las células sin tratar (patente
25 de los EE. UU. n° 5.384.253). Alternativamente, las células receptoras pueden hacerse más susceptibles a la transformación por lesión mecánica.

[0157] La transfección de células eucariotas mediante electroporación ha tenido bastante éxito. De esta manera se han transfectado linfocitos pre-B de ratón con los genes de la inmunoglobulina humana (Potter y col.,
30 1984) y hepatocitos de rata con el gen de la cloranfenicol-acetil-transferasa (Tur-Kaspa y col., 1986).

iv. Fosfato de calcio

[0158] En otras realizaciones de la presente invención se introduce un ácido nucleico en las células mediante precipitación con fosfato de calcio. Las células KB humanas han sido transfectadas con ADN de adenovirus 5
35 (Graham y Van Der Eb, 1973) mediante esta técnica. De esta manera también se han transfectado células L(A9) de ratón, células C127 de ratón, células CHO, CV-1, BHK, NIH3T3 y HeLa con un gen marcador de neomicina (Chen y Okayama, 1987) y hepatocitos de rata con diversos genes marcadores (Rippe y col., 1990).

40 v. DEAE-dextrano

[0159] En otra realización, un ácido nucleico se administra a una célula mediante DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol. De esta manera se han introducido plásmidos indicadores en células de mieloma y de eritroleucemia
45 de ratón (Gopal, 1985).

vi. Carga por ultrasonidos

[0160] Otras realizaciones adicionales de la presente invención incluyen la introducción de un ácido nucleico por carga directa por ultrasonidos. Mediante carga por ultrasonidos se han transfectado fibroblastos LTK con el gen
50 de la timidina-cinasa (Fechheimer y col., 1987).

vii. Transfección mediada por liposomas

[0161] En otra realización de la invención, un ácido nucleico puede atraparse en un complejo lipídico como,
55 por ejemplo, un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de disolución acuosa. Los componentes lipídicos sufren una autorreorganización antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas (Ghosh y Bachhawat, 1991). También se considera un
60 ácido nucleico complejado con lipofectamina (Gibco BRL) o Superfect (Qiagen).

[0162] La administración de un ácido nucleico mediada por liposomas y la expresión del ADN extraño *in vitro*

han tenido gran éxito (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y col., 1979; Nicolau y col., 1987). También se ha demostrado la viabilidad de la administración mediada por liposomas y la expresión del ADN extraño en células cultivadas de embrión de pollo, HeLa y de hepatoma (Wong y col., 1980).

- 5 **[0163]** En ciertas realizaciones de la invención, un liposoma puede complejarse con un virus hemaglutinante (VHJ). Se ha demostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y promueve la entrada en la célula del ADN encapsulado en el liposoma (Kaneda y col., 1989). En otras realizaciones, un liposoma puede complejarse o emplearse en combinación con proteínas cromosómicas nucleares no histónicas (HMG-1) (Kato y col., 1991). En otras realizaciones adicionales, un liposoma puede complejarse o emplearse en combinación con ambos VHJ y
10 HMG-1. En otras realizaciones, un vehículo de administración puede comprender un ligando y un liposoma.

viii. Transfección mediada por receptores

- [0164]** Además aún, un ácido nucleico puede administrarse a una célula diana por medio de vehículos de
15 administración mediada por receptores. Estos aprovechan la absorción selectiva de macromoléculas por endocitosis mediada por receptores que tendrá lugar en la célula diana. A la vista de la distribución específica del tipo de célula de diversos receptores, este procedimiento de administración añade otro grado de especificidad a la presente invención.

- 20 **[0165]** Ciertos vehículos de direccionamiento génico mediado por receptores comprenden un ligando específico para un receptor celular y un agente de unión a ácidos nucleicos. Otros comprenden un ligando específico para un receptor celular al que se ha unido operativamente el ácido nucleico que ha de administrarse. Para la transferencia génica mediada por receptores se ha usado varios ligandos (Wu y Wu, 1987; Wagner y col., 1990; Perales y col., 1994; Myers, documento EPO 0273085), lo que establece la viabilidad de la técnica. Se ha descrito
25 una administración específica en el contexto de otro tipo de células de mamífero (Wu y Wu, 1993). En ciertos aspectos de la presente invención se elegirá un ligando que se corresponda con un receptor expresado específicamente en la población de células diana.

- [0166]** En otras realizaciones, un componente vehicular para la administración de un ácido nucleico de un
30 vehículo de direccionamiento de un ácido nucleico específico de la célula puede comprender un ligando de unión específica en combinación con un liposoma. El ácido nucleico o los ácidos nucleicos que han de administrarse se alojan dentro del liposoma y el ligando de unión específica se incorpora funcionalmente en la membrana del liposoma. De este modo, el liposoma se une específicamente al receptor o receptores de una célula diana y administra su contenido a la célula. Se ha demostrado que estos sistemas son funcionales con sistemas en los que,
35 por ejemplo, se usa el factor de crecimiento epidérmico (EGF) en la administración mediada por receptores de un ácido nucleico a células que muestran una regulación por aumento del receptor de EGF.

- [0167]** En otras realizaciones más, el componente vehicular para la administración de un ácido nucleico de un
40 vehículo de administración dirigida puede ser un liposoma en sí mismo, que preferentemente comprenderá uno o más lípidos o glicoproteínas que dirigen la unión específica de la célula. Por ejemplo, se ha incorporado lactosilceramida, un asialogangliósido con galactosa terminal, en liposomas y se ha observado un aumento de la absorción del gen de la insulina por hepatocitos (Nicolau y col., 1987). Se considera que las construcciones de transformación específicas de tejidos de la presente invención pueden administrarse a una célula diana de manera similar.

45

E. Administración combinada de genes terapéuticos y agentes que dañan el ADN

I. Administración

- 50 **[0168]** Los tumores que pueden tratarse con la presente invención incluyen, pero no se limitan a tumores del cerebro (glioblastomas, meduloblastoma, astrocitoma, oligodendroglioma, ependimomas), pulmón, hígado, bazo, riñón, ganglios linfáticos, intestino delgado, páncreas, células sanguíneas, colon, estómago, mama, endometrio, próstata, testículo, ovario, piel, cabeza y cuello, esófago, médula ósea, sangre u otro tejido. El tumor puede distinguirse entre metastásico y no metastásico. Diversas realizaciones incluyen células tumorales de la piel,
55 músculo, fascia, cerebro, próstata, mama, endometrio, pulmón, cabeza y cuello, páncreas, intestino delgado, células sanguíneas, hígado, testículos, ovarios, colon, piel, estómago, esófago, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea o riñón. Otras realizaciones incluyen muestras de fluidos como sangre periférica, líquido linfático, ascitis, líquido seroso, efusión pleural, esputo, líquido cefalorraquídeo, líquido lagrimal, heces u orina.

- 60 **[0169]** De acuerdo con la presente invención, se proporciona la administración de un vector de expresión controlado por Egr-1 y un agente que daña el ADN. Esta combinación es capaz de afectar a una enfermedad hiperproliferativa (p. ej. cáncer) en un sujeto, por ejemplo, por destrucción de una o más células diana, inducción de

apoptosis en una o más células diana, reducción de la tasa de crecimiento de una o más células diana, reducción de la incidencia del número de metástasis, reducción del tamaño de un tumor, inhibición del crecimiento de un tumor, reducción del suministro sanguíneo a un tumor o a una o más células diana, estimulación de la respuesta inmunitaria contra una o más células diana o un tumor, prevención o inhibición de la progresión de un cáncer o aumento de la esperanza de vida de un sujeto con un cáncer.

[0170] Más en general, los agentes se proporcionan en una cantidad combinada con una dosis eficaz para destruir o inhibir la proliferación de una célula cancerosa. Este proceso puede implicar la puesta en contacto de la(s) célula(s) con los agentes simultáneamente o dentro de un periodo de tiempo en el que la administración separada de los agentes a una célula, tejido u organismo produce un beneficio terapéutico deseado. Esto puede conseguirse poniendo en contacto la célula, el tejido o el organismo con una única composición o formulación farmacológica que incluye ambos agentes o poniendo en contacto la célula con dos o más composiciones o formulaciones distintas.

[0171] Los términos “puesto en contacto” y “expuesto”, cuando se aplican a una célula, tejido u organismo, se usan en este documento para describir el proceso por el que una construcción terapéutica y un agente que daña el ADN se administran a una célula, tejido u organismo diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula, tejido u organismo diana. Para conseguir la muerte o la estasis de la célula, los agentes se administran a una o más células en una cantidad combinada eficaz para destruir las células o impedir su división.

[0172] La construcción de expresión puede preceder, coincidir con y/o seguir al agente que daña el ADN en intervalos que varían de minutos a semanas. En las realizaciones en las que los agentes se administran por separado a una célula, tejido u organismo, generalmente debería asegurarse que no pase un periodo de tiempo significativo entre los momentos de cada administración, de modo que el agente que daña el ADN sea todavía capaz de inducir la expresión desde el promotor Egr-1 en la célula, tejido u organismo. Por ejemplo, en tales casos se considera que es posible poner en contacto la célula, tejido u organismo con los agentes de manera sustancialmente simultánea (es decir, en un espacio de menos de aproximadamente un minuto). En otros aspectos, los agentes pueden administrarse con una separación de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 25 horas, aproximadamente 26 horas, aproximadamente 27 horas, aproximadamente 28 horas, aproximadamente 29 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 31 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 33 horas, aproximadamente 34 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 37 horas, aproximadamente 38 horas, aproximadamente 39 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 41 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 43 horas, aproximadamente 44 horas, aproximadamente 45 horas, aproximadamente 46 horas, aproximadamente 47 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 17 días, aproximadamente 18 días, aproximadamente 19 días, aproximadamente 20 días, aproximadamente 21 días, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7 o aproximadamente 8 semanas o más y cualquier intervalo derivable de lo anterior.

[0173] Pueden emplearse diversas combinaciones. Algunos ejemplos no limitantes de estas combinaciones se muestran a continuación, en que un vector con Egr-1 es “A” y un agente que daña el ADN es “B”:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
 B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0174] También se consideran otras combinaciones.

[0175] La administración de los agentes de la presente invención puede seguir protocolos generales para la administración de agentes quimioterapéuticos o de terapia génica, teniendo en cuenta la toxicidad si la hubiera. Se espera una repetición de los ciclos de tratamiento según sea necesario. En realizaciones particulares se considera

que es posible administrar varios agentes adicionales en cualquier combinación con la presente invención.

[0176] Una "cantidad eficaz" se define como una cantidad del agente que disminuye, reduce, inhibe o impide de otra manera el crecimiento de una célula cancerosa, induce apoptosis, inhibe metástasis, destruye células o induce citotoxicidad en células.

[0177] En general, los agentes pueden administrarse por vía intravenosa, intraarterial, intratumoral, parenteral o intraperitoneal. En particular, se prevé que la administración local, regional y sistémica del vector con Egr-1 y del agente que daña el ADN a pacientes con cánceres serán todos procedimientos adecuados. La administración local también es útil e incluye la inyección directa en la masa tumoral, la inyección perimetral e inyecciones o baños del lecho de un tumor extirpado. La administración regional puede incluir la administración en la vasculatura tumoral o en el suministro sanguíneo regional. Alternativamente, la administración sistémica de cada uno o los dos agentes, el que daña el ADN y el vector con Egr-1, es apropiada en determinadas circunstancias, por ejemplo, cuando se ha producido una extensa metástasis.

II. Formulaciones

[0178] Generalmente, las formas farmacéuticas de los agentes se preparan para uso como disoluciones o dispersiones inyectables. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida de manera que sea fácilmente inyectable. También debe ser estable en las condiciones de preparación y almacenamiento y preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de estos y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede conseguirse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos sería preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0179] Las disoluciones inyectables estériles se preparan por incorporación de los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado junto con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan por incorporación de los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier otro ingrediente deseado a partir de una disolución de estos previamente esterilizada por filtración.

[0180] Según se usa en este documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de estos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en el caso de que sea incompatible con el principio activo, se considera el uso de cualquier medio o agente convencional en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse principios activos suplementarios en las composiciones.

F. Terapias auxiliares

I. Agentes radioterapéuticos

[0181] Los agentes y factores radioterapéuticos incluyen radiación y ondas que inducen daños en el ADN, por ejemplo radiación γ , rayos X, radiación UV, microondas, emisiones electrónicas, radioisótopos y similares. La terapia puede conseguirse mediante la irradiación del sitio localizado del tumor con las formas de radiación descritas anteriormente. Lo más probable es que todos estos factores causen una amplia gama de daños en el ADN, en los precursores de ADN, en la replicación y reparación del ADN y en el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas.

[0182] Los intervalos de dosificación para rayos X varían desde dosis diarias de 50 a 200 roentgen durante periodos de tiempo prolongados (tres a cuatro semanas) a dosis únicas de 2.000 a 6.000 roentgen. Los intervalos de dosificación para radioisótopos varían ampliamente y dependen de la semivida del radioisótopo, la intensidad y el tipo de radiación emitida y de la absorción por las células neoplásicas.

II. Cirugía

- [0183]** Generalmente, el tratamiento quirúrgico para la extirpación de un crecimiento canceroso es un procedimiento estándar para el tratamiento de tumores y cánceres. Este tratamiento intenta extirpar la totalidad del crecimiento canceroso o de reducirlo con el fin de hacer que otra terapia sea más eficaz, p. ej., combinado con quimioterapia y/o radioterapia para asegurar la destrucción de cualquier célula neoplásica o maligna restante. Por lo tanto, la cirugía puede usarse en combinación con la presente invención.
- 10 **[0184]** Aproximadamente el 60 % de las personas con cáncer se someterán a algún tipo de cirugía, que incluye, por ejemplo, cirugía preventiva, de diagnóstico o estadificación, curativa y paliativa. La cirugía, en particular la cirugía curativa puede usarse en combinación con otras terapias; por ejemplo con la presente invención y uno o más agentes adicionales.
- 15 **[0185]** La cirugía curativa incluye una resección en la que se separa físicamente todo o parte del tejido canceroso, se extirpa y/o se destruye. Se considera también que la cirugía puede separar, extirpar o destruir cánceres superficiales, precánceres o cantidades secundarias de tejido normal. El tratamiento por cirugía incluye, por ejemplo, tumorectomía, cirugía por láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs). La tumorectomía se refiere a la extirpación física de al menos una parte de un tumor. Después de
20 la extirpación de parte o de todas las células, el tejido o tumor cancerosos puede formarse una cavidad en el cuerpo.
- [0186]** El tratamiento posterior del tumor o el área de la cirugía puede realizarse mediante el tratamiento del paciente o del campo quirúrgico con una terapia adicional contra el cáncer. Este tratamiento puede repetirse, por ejemplo, aproximadamente cada 1, aproximadamente cada 2, aproximadamente cada 3, aproximadamente cada 4,
25 aproximadamente cada 5, aproximadamente cada 6 o aproximadamente cada 7 días o aproximadamente cada 1, aproximadamente cada 2, aproximadamente cada 3, aproximadamente cada 4 o aproximadamente cada 5 semanas o aproximadamente cada 1, aproximadamente cada 2, aproximadamente cada 3, aproximadamente cada 4, aproximadamente cada 5, aproximadamente cada 6, aproximadamente cada 7, aproximadamente cada 8, aproximadamente cada 9, aproximadamente cada 10, aproximadamente cada 11 o aproximadamente cada 12
30 meses. Estos tratamientos pueden realizarse también con dosis variables.

III. Terapia inmunitaria

- [0187]** Un agente inmunoterapéutico se basa generalmente en el uso de células y moléculas efectoras inmunitarias para dirigirse específicamente a las células cancerosas y destruirlas. El efector inmunitario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo por sí solo puede servir como efector de la terapia o puede atraer a otras células que son las que de hecho llevan a cabo la destrucción de la célula. El anticuerpo puede conjugarse también con un fármaco o una toxina (p. ej. un agente quimioterapéutico, un radioisótopo, una cadena A de la ricina, una toxina del cólera, una toxina pertúsica, etc.) y
40 servir simplemente como agente de direccionamiento. Tales conjugados de anticuerpos se denominan inmunotoxinas y son bien conocidos en la técnica (véanse las patentes de los EE. UU. 5.686.072, 5.578.706, 4.792.447, 5.045.451, 4.664.911 y 5.767.072). Alternativamente, el efector puede ser un linfocito que porta una molécula superficial que interacciona directa o indirectamente con una célula tumoral diana. Diversas células efectoras incluyen células T citotóxicas y células NK.
- 45 **[0188]** En un aspecto de la inmunoterapia, la célula tumoral debe portar algún marcador que pueda usarse para el direccionamiento, es decir, que no esté presente en la mayoría de las demás células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para el direccionamiento en el contexto de esta invención. Los marcadores tumorales comunes incluyen el antígeno carcinoembrionario, el antígeno específico de la próstata, el antígeno asociado a tumores urinarios, el antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, el antígeno sialilo de Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, *erbB* y p155.

i. Inmunoestimulantes

- 55 **[0189]** Un aspecto específico de la inmunoterapia es el uso de una molécula inmunoestimulante como agente o, más preferentemente, en combinación con otro agente, como por ejemplo una citocina, como por ejemplo IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, el factor de necrosis tumoral; los interferones α , β y γ ; F42K y otros ~~análogos~~ de citocina; una quimiocina como por ejemplo MIP-1, MIP-1 β , MCP-1, RANTES, IL-8; o un factor de crecimiento como por ejemplo el ligando FLT3.
- 60 **[0190]** Una citocina particular que se considera para uso en la presente invención es el factor de necrosis tumoral. El factor de necrosis tumoral (TNF; caquectina) es una glicoproteína que destruye algunos tipos de células

cancerosas, activa la producción de citocinas, activa los macrófagos y las células endoteliales, estimula la producción de colágeno y colagenasas, es un mediador inflamatorio y también un mediador del choque séptico y estimula el catabolismo, la fiebre y el sueño. Algunos agentes infecciosos causan la regresión del tumor a través de la estimulación de la producción de TNF. El TNF puede ser bastante tóxico si se usa por separado en dosis eficaces, de modo que los regímenes óptimos probablemente lo usarán en dosis menores en combinación con otros fármacos. Su actividad inmunosupresora es estimulada por el interferón de modo que la combinación es potencialmente peligrosa. También se ha encontrado que un híbrido de TNF e interferón tiene actividad anticancerígena.

10 **[0191]** Otra citocina que se considera específicamente es el interferón. El interferón α se ha usado en el tratamiento de leucemia de células pilosas, sarcoma de Kaposi, melanoma, carcinoma, cáncer de células renales, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, linfomas no Hodgkin, micosis fungoides, mieloma múltiple y leucemia granulocítica crónica.

15 ii. Inmunoterapia pasiva

[0192] Existen una serie de estrategias diferentes para la inmunoterapia pasiva del cáncer. Pueden clasificarse ampliamente como sigue: inyección de anticuerpos solamente; inyección de anticuerpos acoplados con toxinas o agentes quimioterapéuticos; inyección de anticuerpos acoplados con radioisótopos; inyección de anticuerpos dirigidos contra idiotipos; y finalmente la purga de células tumorales en la médula ósea.

[0193] Preferentemente, en la inmunoterapia pasiva se emplean anticuerpos monoclonales humanos, ya que producen pocos o ningún efecto secundario en el paciente. Sin embargo, su aplicación está algo limitada por su escasez y, por el momento, solamente se han administrado por vía intralesional. Por ejemplo, se han administrado anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra antígenos gangliósidos por vía intralesional a pacientes que padecían melanoma recurrente cutáneo (Irie y Morton, 1986). Después de inyecciones intralesionales diarias o semanales, se observó una regresión en seis de diez pacientes. En otro estudio, se consiguió un éxito moderado con inyecciones intralesionales de dos anticuerpos monoclonales humanos (Irie y col., 1989).

30 **[0194]** Puede ser favorable administrar más de un anticuerpo monoclonal dirigido contra dos antígenos diferentes o incluso anticuerpos con múltiple especificidad de antígeno. Los protocolos de tratamiento pueden incluir también la administración de linfocinas o de otros potenciadores de la inmunidad (Bajorin y col., 1988).

35 iii. Inmunoterapia activa

[0195] En la inmunoterapia activa se administra un péptido, polipéptido o proteína antigénicos o una composición de células tumorales autólogas o alogénicas o "vacuna", generalmente con un adyuvante bacteriano definido (Ravindranath y Morton, 1991; Morton y Ravindranath, 1996; Morton y col., 1992; Mitchell y col., 1990; Mitchell y col., 1993). En la inmunoterapia del melanoma, aquellos pacientes que producen una alta respuesta de IgM con frecuencia sobreviven mejor que los que producen pocos o ningún anticuerpo IgM (Morton y col., 1992). Los anticuerpos IgM son a menudo anticuerpos transitorios y la excepción de la regla parecen ser anticuerpos contra gangliósidos o contra carbohidratos.

45 iv. Inmunoterapia adoptiva

[0196] En la inmunoterapia adoptiva, los linfocitos circulantes del paciente o linfocitos infiltrados en el tumor se aíslan *in vitro*, se activan mediante linfocinas como IL-2 o se transducen con genes de necrosis tumoral y vuelven a administrarse (Rosenberg y col., 1988; 1989). Para conseguir esto, se administrará a un paciente animal o humano una cantidad inmunológicamente eficaz de linfocitos activados en combinación con una composición de péptidos antigénicos con adyuvantes incorporados según se describe en este documento. Con la mayor preferencia, los linfocitos activados serán las propias células del paciente, aisladas previamente de una muestra de sangre o tumoral y activadas (o "expandidas") *in vitro*. Esta forma de inmunoterapia ha producido varios casos de regresión de melanoma y de carcinoma renal, pero el porcentaje de respuestas fue bajo en comparación con los casos sin respuesta.

55 G. Análisis y supervisión de la eficacia de la terapia

[0197] Se considera que en el contexto de la presente invención pueden aislarse células, bien tumorales, normales o ambas, tumorales y normales de un individuo con el fin de supervisar el progreso del tratamiento o como parte del tratamiento. Se espera que pueda supervisarse la eficacia del tratamiento mediante el aislamiento de estas células y su tratamiento con la tinción DAPI para determinar el nivel de condensación de la cromatina, medir el nivel de apoptosis, medir el nivel de producción de esfingomielinasa neutra u otros procedimientos como los siguientes.

[0198] Un procedimiento particular para determinar la inducción de apoptosis es el ensayo de marcaje terminal de cortes con dUTP-biotina catalizado por desoxinucleotidil-transferasa terminal (TUNEL), que mide la integridad del ADN (Gorczyca, 1993). Este ensayo mide la fragmentación del ADN mediante la supervisión de la incorporación de UTP marcado en las hebras rotas de ADN por la enzima transferasa terminal. La incorporación puede supervisarse por metodologías de electroscopía o de separación celular (p. ej., FACS).

H. Administración *ex vivo*

10 **[0199]** En la presente invención se considera que puede emplearse la terapia génica *ex vivo*: el aislamiento de células de un animal o un paciente, el tratamiento de las células *in vitro* y el retorno de las células modificadas al animal o individuo. Esta estrategia permite dosis más altas de la terapia y la adición de otros factores que pueden no ser posibles en el planteamiento *in vivo*. En particular, se usa el trasplante autólogo de células de médula ósea (CMO) como un procedimiento de recuperación en el que se toma sangre o médula ósea y se almacena antes de una intensificación de la radiación o la quimioterapia. El tratamiento de estas células para prevenir la reintroducción del cáncer es muy beneficioso.

20 **[0200]** Al preparar células mononucleares humanas (CMN), una alícuota de médula se coloca en capas en un recipiente como un tubo de centrífuga. Inicialmente las CMN pueden obtenerse de una fuente de médula ósea, p. ej., tibias, fémures, columna vertebral, costillas, caderas, esternón, así como los húmeros, radios, cúbitos, tibias y peronés. Adicionalmente, estas células pueden obtenerse también de sangre del cordón umbilical, sangre periférica o sangre periférica movilizada con citocinas. Otras fuentes de células madre hematopoyéticas humanas incluyen el saco embrionario, el hígado fetal, el bazo fetal y de adultos y la sangre. La capa de médula se centrifuga para producir un sedimento de células rojas en el fondo del tubo, una capa clara de medio, una capa de interfase que contiene las CMN y una capa de medio de plasma en la parte superior. La capa de interfase puede separarse, por ejemplo, mediante succión. Finalmente, la centrifugación de esta capa a 1.000 g da lugar a un sedimento de CMN. Este sedimento puede resuspenderse entonces en un tampón adecuado para la separación celular por FAGS. Las CMN aisladas se clonan *in vitro* para expandir las células con actividad inmunológica. Las células expandidas con actividad terapéutica se suministran entonces al paciente para obtener un efecto terapéutico.

30

I. Ensayos clínicos

[0201] Este ejemplo se refiere al desarrollo de protocolos de tratamiento de humanos por procedimientos que comprenden: a) proporcionar una construcción de expresión que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica para el cáncer, en que el segmento de ácido nucleico está colocado bajo el control de un promotor Egr-1; b) administrar la construcción de expresión a un sujeto humano en combinación con un compuesto que daña el ADN que puede inducir radicales libres. Los procedimientos pueden comprender además la administración al paciente de otros compuestos terapéuticos para el cáncer, radiación ionizante y/o otra terapia auxiliar para el cáncer. Estos procedimientos serán útiles en el tratamiento clínico de diversos cánceres/tumores y enfermedades en las que intervienen células transformadas o cancerosas. Este tratamiento será una herramienta particularmente útil en la terapia antitumoral, por ejemplo, en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer de cerebro, cáncer de piel, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de tráquea, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer linfóide, leucemia, cáncer de cérvix o cáncer de vulva.

45

[0202] El compuesto inductor de radicales libres que daña el ADN puede ser un compuesto de platino como cisplatino, una mostaza nitrogenada, Cytoxan, ciclofosfamida, mitomicina c, adriamicina, ifosfamida, bleomicina, doxorubicina, procarbazona, actinomicina, clorambucilo, carboplatino, busulfán, bcnu, ccnu, hexametilmelamina, oxaliplatino, epirubicina, daunorrubicina, camptotecina o mitoxantrona. Puede usarse cualquier proteína con propiedades anticancerígenas y algunos ejemplos de estos compuestos se describen en otra parte de la memoria descriptiva.

50

[0203] Los diversos elementos de la realización de un ensayo clínico, incluidos el tratamiento y la supervisión del paciente, son conocidos para el experto en la técnica a la luz de la presente descripción. La siguiente información se presenta como una directriz general para uso en el establecimiento de ensayos clínicos con el uso de los procedimientos de la invención.

55

[0204] Los candidatos para un ensayo clínico de fase I serán los pacientes en los que han fracasado todas las terapias convencionales. Las formulaciones terapéuticas de la invención se administrarán semanalmente a modo de prueba. La eficacia de la terapia y el curso de la enfermedad pueden evaluarse mediante la supervisión periódica de parámetros como el tamaño del tumor, la presencia de marcadores tumorales y/o la infiltración de médula ósea por células cancerosas. Las pruebas que se usarán para supervisar la evolución de los pacientes y la eficacia de los

60

tratamientos incluyen: examen físico, rayos X, análisis de sangre y otras metodologías de laboratorio. Además, se extraerán muestras de sangre periférica y de médula ósea para evaluar la expresión de la proteína anticancerígena expresada por el vector. Las dosis administradas en el estudio de fase I se aumentarán como en los ensayos clínicos de fase I estándar, es decir, las dosis se aumentarán hasta alcanzar los intervalos tolerables máximos.

5

[0205] Las respuestas clínicas pueden definirse por una medición aceptable. Por ejemplo, una respuesta completa puede definirse por la desaparición completa de evidencia de células cancerosas durante al menos dos meses. Mientras que una respuesta parcial puede definirse por una reducción del 50 % de las células cancerosas durante al menos dos meses.

10

[0206] El típico ciclo del tratamiento dependerá del paciente individual y de la enfermedad que se trate de manera conocida para los expertos en la técnica. Un típico ciclo de tratamiento puede comprender aproximadamente seis dosis administradas en un periodo de siete a 21 días. A elección del médico, el régimen puede continuarse con seis dosis cada tres semanas o con menor frecuencia (mensual, bimensual, trimestral, etc.). Por ejemplo, un paciente con cáncer de pulmón puede tratarse en ciclos de ocho semanas, aunque puede usarse una mayor duración si no se observan efectos secundarios en el paciente y pueden resultar periodos de tratamiento más cortos si el paciente no tolera el tratamiento de la forma esperada. Cada ciclo consistirá en entre 20 y 35 dosis individuales igualmente espaciadas, aunque esto también puede variarse dependiendo de la situación clínica. Por supuesto, estos son solamente tiempos de tratamiento ejemplares y el experto en la técnica reconocerá que son posibles otros ciclos temporales.

15

20

[0207] Aunque no necesariamente, los pacientes pueden haber recibido tratamientos previos o concurrentes de cirugía, de quimio o radioterapia o de terapia génica. De manera óptima, el paciente mostrará una actividad adecuada de la médula ósea (definida como un recuento absoluto de granulocitos periféricos $> 2.000/\text{mm}^3$ y un recuento de plaquetas de $100.000/\text{mm}^3$), una adecuada actividad hepática (bilirrubina 1,5 mg/dl) y una adecuada actividad renal (creatinina 1,5 mg/dl).

25

[0208] Típicamente, las composiciones terapéuticas de la presente invención se administrarán por vía parenteral en formulaciones de dosificación unitaria con soportes, adyuvantes y vehículos estándar, bien conocidos, no tóxicos y fisiológicamente aceptables, según se desee. El término parenteral según se usa en este documento incluye técnicas intravenosas, intratumorales, subcutáneas, intramusculares, intra o de infusión. Estas composiciones se proporcionarán en una cantidad eficaz para destruir la célula o inhibir su proliferación.

30

[0209] La administración regional de las composiciones es un procedimiento eficiente para administrar una dosis terapéuticamente eficaz para contrarrestar la enfermedad clínica. Alternativamente, puede ser apropiada la administración sistémica. Las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden administrarse al paciente directamente en el sitio del tumor. Normalmente, el volumen de la composición deberá ser suficiente para asegurar que la totalidad de la superficie del tumor entra en contacto con la composición terapéutica. En una realización, la administración implica simplemente la inyección de la composición terapéutica en el tumor. En otra realización, se inserta un catéter en el sitio del tumor y la cavidad puede perfundirse continuamente durante un periodo de tiempo deseado.

35

40

[0210] Por supuesto, los regímenes de tratamiento descritos anteriormente pueden alterarse de acuerdo con el conocimiento adquirido en los ensayos preclínicos. Los expertos en la técnica serán capaces de asumir la información desvelada en esta memoria descriptiva y optimizar los regímenes de tratamiento.

45

J. Ejemplos

[0211] Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deberán apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen representan técnicas que el inventor ha descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención y que, por tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica.

50

EJEMPLO 1

55

Procedimientos

[0212] Células y cultivos celulares. Las líneas celulares Seg-1, un adenocarcinoma esofágico humano (Dr. David Beer, Universidad de Michigan, Ann Arbor, MI, EE. UU.) y DHD/K12/TRb (PROb), un adenocarcinoma de rata establecido en ratas singénicas BD-IX por inducción con 1,2-dimetilhidrazina (Dr. Francois Martin, Universidad de Dijon, Francia) se mantuvieron en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GibcoBRL, Grand Island, NY, EE. UU.) complementado con suero bovino fetal (FBS, 10 % v/v) (Intergen, Purchase, NY, EE. UU.), penicilina

60

(100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) (GibcoBRL), a 37 °C y con el 7,5 % de CO₂.

[0213] Animales. Los ratones atímicos sin pelo (Frederick Cancer Research Institute, Frederick, MD, EE. UU.) recibieron comida y agua *ad libitum*. Los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices de la Universidad de Chicago.

[0214] Vectores víricos. Los vectores víricos Ad.Egr.TNF.11D y Ad.Null.3511.11D (GenVec, Gaithersburg, MD, EE. UU.) se almacenaron a -80 °C y se diluyeron a la concentración adecuada en el tampón de formulación.

10 **[0215] Medición de la proteína TNF-α *in vitro*.** Se inocularon células Seg-1 y PROb en placas de doce pocillos (Becton Dickinson, Bedford, MA, EE. UU.) con 10⁵ células/pocillo, se incubaron durante la noche y se infectaron con Ad.Null.3511.11D o Ad.Egr.TNF.11D, con una multiplicidad de infección (MDI) de 100 en un medio sin suero durante 2-3 horas. Las células tratadas con IR en medio completo se expusieron a 5 Gy con el uso de un generador de rayos X Pantak PCM 1000. Las células en el grupo del cisplatino se expusieron a cisplatino 5 µM en medio completo. Las células y los sobrenadantes se recogieron por raspado a las 24, 48 y 72 horas y la producción de TNF-α se cuantificó mediante ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.) después de tres ciclos lisis por congelación y descongelación. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se usaron placas de tratamiento duplicadas para tener en cuenta la citotoxicidad de IR y cisplatino. Las células se recogieron mediante Versene (EDTA al 0,02 % en HBSS) y tripsina-EDTA (tripsina al 0,25 %, EDTA.4Na 1 mM) (GibcoBRL) y se realizó un recuento de células con un hemocitómetro mediante exclusión con azul de tripano (0,4 %). Se llevaron a cabo ensayos de proteínas para estandarizar en función de la concentración de proteína (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.).

25 **[0216] Ensayo indicador de luciferasa *in vitro*.** Las construcciones de Egr-1, pE425 (596 pares de bases que contienen todos los elementos CArG, sin sitios AP-1) y pE660 (el promotor Egr-1 mínimo, 115 pares de bases sin elementos CArG) (Datta y col., 1993) se evaluaron después de la confirmación de la secuencia y la inserción del producto de PCR en la construcción plasmídica indicadora con luciferasa de luciérnaga pGL3-Basic (Promega, Madison, WI, EE. UU.) mediante restricción enzimática y ligación. Se transformaron células competentes JM109 (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.) con estos plásmidos, se obtuvieron maxipreparaciones sin endotoxinas (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) y el producto se confirmó por PCR, secuenciación, restricción enzimática y electroforesis en gel. Las células Seg-1 y PROb se inocularon en placas de 12 pocillos con 10⁵ células/pocillo y se transfectaron con las construcciones plasmídicas indicadoras con luciferasa de luciérnaga, pGL3-Basic (sin promotor, control negativo), pGL3 660 (promotor Egr-1 mínimo) o pGL3 425 (promotor Egr-1 con todos los elementos CArG) mediante el agente de transfección TransFast (Promega). Todos los grupos se cotransfectaron con la construcción plasmídica indicadora con luciferasa de *Renilla*, pRL-TK (promotor de la timidina-cinasa de VHS), para normalizar por eficiencia de transfección. A las 48 horas, las células se expusieron a IR (20 Gy) o cisplatino (5 µM). Las células se recogieron seis horas después y la actividad luciferasa se midió mediante el sistema de ensayo del indicador Dual-Luciferase (Promega).

40 **[0217] Medición de la proteína TNF-α *in vivo*.** Se inyectaron células Seg-1 o PROb (5 x 10⁶/0,1 ml) en la extremidad trasera derecha de ratones sin pelo. Los ratones con tumores se aleatorizaron en uno de cuatro grupos: Ad.Null.3511.11D (2 x 10⁸ u.p./10 µl) intratumoral (IT), con disolución salina normal (NS) o cisplatino (8 mg/kg) intraperitoneal (IP) y Ad.Egr.TNF.11D (2 x 10⁸ u.p./10 µl) IT con NS o cisplatino IP. Los tratamientos IP con NS o cisplatino se administraron después del tratamiento IT con el vector. Se administraron dos inyecciones consecutivas IT e IP. Los animales se sacrificaron y los xenoinjertos se recogieron 48 horas después de la segunda inyección IP. Los xenoinjertos se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en el tampón RIPA (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, pH 7,5, EDTA 5 mM, pH 7,5, PMSF 100 mM, leupeptina 1 µg/ml, aprotinina 2 µg/ml) mediante un homogeneizador Brinkman Polytron (Kinematica AG, Lucerna, Suiza). Después de tres ciclos de lisis por congelación/descongelación, el homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm (rotor Sorvall RC5C SS34) durante 10 minutos a 4 °C. Las concentraciones de TNF-α en los sobrenadantes se midieron mediante ELISA y se realizaron ensayos de proteínas (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.).

55 **[0218] Estudios de nuevo crecimiento *in vivo*.** Se inyectaron células Seg-1 o PROb (5 x 10⁶/0,1 ml) en la extremidad trasera derecha de ratones sin pelo. Los ratones con tumores se asignaron a uno de cuatro grupos: Ad.Null.3511.11D (2 x 10⁸ u.p./10 µl) intratumoral (IT), con disolución salina normal (NS) o cisplatino (3 mg/kg) intraperitoneal (IP) y Ad.Egr.TNF.11D (2 x 10⁸ u.p./10 µl) IT con NS o cisplatino IP. Las inyecciones IP de NS o cisplatino se administraron después de la inyección IT del vector y se administraron cuatro inyecciones IT e IP consecutivas diarias. Los xenoinjertos se midieron cada dos días mediante calibres y se calculó el volumen de los tumores (largo x ancho x grueso)/2. Las fracciones del volumen tumoral (V/V₀, V₀ = volumen el día 0) se calcularon y se representaron.

60 **[0219] Análisis estadístico.** La significación estadística se determinó mediante la prueba de la t de Student de dos colas.

EJEMPLO 2**Inducción de TNF- α *in vivo* en células tumorales humanas y de rata después de la infección con Ad.Egr.TNF.11D y la exposición a cisplatino**

[0220] Dado que Egr-1 es inducido a través de los elementos CA α G de su promotor por ROI y/o daños en el ADN, se analizó la producción de TNF- α por células tumorales infectadas con un vector adenovirico con elementos CA α G situados delante de un ADNc de TNF- α (Ad.Egr.TNF.11D) después de su exposición a cisplatino, un agente que daña el ADN al alterar el estado redox celular (Davis y col., 2001). La producción de TNF- α se analizó en células esofágicas humanas Seg-1 y en células colorrectales de rata PROb después de su exposición a cisplatino 5 μ M. Las concentraciones de TNF- α se determinaron mediante un ensayo ELISA específico para TNF- α humano. La proteína TNF- α no fue detectable en los sedimentos de células Seg-1 ni en los sobrenadantes de cultivos infectados con el vector nulo (Ad.Null.3511.11D) y tratados con IR o cisplatino. En contraste, se detectaron cantidades significativas de la proteína TNF- α en cultivos de células Seg-1 infectadas con el vector Ad.Egr.TNF.11D y expuestas a IR (5 Gy) a las 24, 48 y 72 horas (768,8 \pm 32,6, 593,0 \pm 27,6, 746,0 \pm 18,5, respectivamente) en comparación con las células solamente infectadas con el vector (269,3 \pm 1,9, 167,8 \pm 8,4, 260,6 \pm 14,9; $P < 0.001$). El tratamiento combinado con Ad.Egr.TNF.11D + IR resultó en un aumento de la producción de TNF de 2,9, 3,5 y 2,9 veces. Una inducción similar de la proteína TNF- α se detectó en las células Seg-1 infectadas con el vector Ad.Egr.TNF.11D y expuestas a cisplatino 5 μ M en comparación con el vector solo a las 24 horas (885,3 \pm 28,7), 48 horas (892,6 \pm 21,3) y 72 horas (901,7 \pm 21,7; $P < 0,001$, FIG. 5A). El tratamiento combinado con Ad.Egr.TNF.11D + cisplatino resultó, por tanto, en un aumento de la producción de TNF de 3,3, 5,3 y 3,5 veces.

[0221] Se realizaron experimentos comparables con cultivos de células PROb. De nuevo, la proteína TNF- α no fue detectable en los sedimentos de células PROb ni en los sobrenadantes de cultivos infectados con el vector nulo (Ad.Null.3511.11D) y tratados con IR o cisplatino. Se detectaron cantidades significativas de la proteína TNF- α en cultivos de células PROb infectadas con el vector Ad.Egr.TNF.11D y expuestas a IR (5 Gy) a las 24, 48 y 72 horas (55,1 \pm 4,6, 440,5 \pm 7,0, 812,7 \pm 8,9, respectivamente) en comparación con las células solamente infectadas con el vector (17,9 \pm 1,7, 169,7 \pm 5,2, 522,5 \pm 11,3; $P < 0.001$). El tratamiento combinado con Ad.Egr.TNF.11D + IR resultó en un aumento de la producción de TNF de 3,1, 2,6 y 1,6 veces. Una inducción similar de la proteína TNF- α se detectó en las células Seg-1 infectadas con el vector Ad.Egr.TNF.11D y expuestas a cisplatino 5 μ M en comparación con el vector solo a las 24, 48 y 72 horas (52,4 \pm 0,6, 318,6 \pm 30,6, 812,2 \pm 11,0; $P < 0,001$, FIG. 5B). El tratamiento combinado con Ad.Egr.TNF.11D + cisplatino resultó en un aumento de la producción de TNF de 2,9, 1,9 y 1,6 veces. Estos resultados con las líneas celulares Seg-1 y PROb demuestran que IR y cisplatino inducen la expresión de TNF- α por activación del promotor Egr-1.

[0222] Con un vector que se dirige selectivamente a los tumores, una construcción genética inducible por cisplatino aumenta los efectos del cisplatino, en este caso por TNF- α . El cisplatino y TNF- α tienen distintos mecanismos de destrucción celular y por lo tanto, las células resistentes a cisplatino pueden ser sensibles a TNF- α y viceversa. Además, una alta concentración intratumoral de TNF- α induce necrosis por daños en la microvasculatura tumoral, lo que puede ser útil en el tratamiento de tumores resistentes a TNF- α y cisplatino. Por consiguiente, la estrategia con cisplatino y Ad.Egr.TNF.11D es una terapia eficaz para tumores localizados que no se tratan eficazmente por radioterapia o cirugía. Además, Ad.Egr.TNF.11D puede aumentar los efectos locales de la combinación de quimio y radioterapia.

EJEMPLO 3**Los elementos CA α G del promotor Egr-1 intervienen en la inducción de TNF- α por cisplatino**

[0223] Para estudiar si los elementos CA α G del promotor Egr-1 son inducibles por cisplatino, se evaluó la actividad del promotor Egr-1 por medición de la activación del gen indicador de luciferasa en células Seg-1 y PROb cotransfectadas con las construcciones plasmídicas indicadoras con luciferasa de luciérnaga, pGL3-Basic (control negativo), pGL3 660 (que consta solo del promotor Egr-1 mínimo, sin elementos CA α G) o pGL3 425 (que consta de todos los elementos CA α G, sin sitios AP-1) y la construcción plasmídica indicadora con luciferasa de *Renilla*, pRL-TK. Una actividad luciferasa (AL) mínima pudo detectarse en las células Seg-1 transfectadas con la construcción plasmídica pGL3-Basic (AL = 0,01-0,02) o con la construcción plasmídica pGL3 660 (AL = 0,10-0,18). Sin embargo, las células Seg-1 transfectadas con la construcción plasmídica pGL3 425 mostraron un aumento de la actividad luciferasa relativa de 2,4 veces ($P = 0,005$) (AL = 15,07) después de la exposición a IR (20 Gy) en comparación con el control sin tratar (AL = 6,37) y un aumento de la actividad luciferasa de 2,0 veces ($P = 0,005$) (AL = 2,89) después de la exposición a cisplatino (50 μ M) en comparación con el control sin tratar (FIG. 6A).

[0224] Con la línea celular PROb se obtuvieron resultados similares. Una actividad luciferasa mínima pudo

detectarse en las células PROb transfectadas con la construcción plasmídica pGL3-Basic (AL = 0,21-0,30) o con la construcción plasmídica pGL3 660 (AL = 0,76-1,84). Las células PROb transfectadas con la construcción plasmídica pGL3 425 mostraron un aumento de la actividad luciferasa de 4,2 veces ($P = 0,004$) (AL = 57,75) después de la exposición a IR (20 Gy) en comparación con el control sin tratar (AL = 13,69) y un aumento de la actividad luciferasa de 3,6 veces ($P = 0,01$) (AL = 49,40) después de la exposición a cisplatino (50 μM) en comparación con el control sin tratar (FIG. 6B). Estos datos demuestran que los elementos CArG del promotor Egr-1 son inducibles por cisplatino e intervienen en la activación transcripcional del gen quimérico Egr-1.TNF- α .

EJEMPLO 4

10

Inducción de TNF- α en xenoinjertos tumorales humanos y de ratas de tratamiento con Ad.Egr.TNF.11D y cisplatino

[0225] Se analizó la inducción de TNF- α por cisplatino después de la infección de tumores humanos y de roedores con el vector Ad.Egr.TNF.11D. Se administraron inyecciones intratumorales (IT) de Ad.Null.3511.11D o Ad.Egr.TNF.11D a xenoinjertos de células Seg-1 o PROb que crecían en las extremidades posteriores de ratones atímicos sin pelo. Los ratones con tumores recibieron inyecciones IP de disolución salina normal (NS) o cisplatino (3 mg/kg). La concentración de TNF- α en los homogeneizados de los tumores se cuantificó mediante ELISA.

20 [0226] La proteína TNF- α no pudo detectarse en los homogeneizados de tumores de células Seg -1 después de la inyección del vector Ad.Null.3511.11D y del tratamiento sistémico con NS o cisplatino. Un aumento significativo (3,5 veces) en la proteína TNF- α intratumoral se observó después del tratamiento combinado con Ad.Egr.TNF.11D + cisplatino (1.294,0 \pm 438,5 pg/mg) en comparación con el tratamiento solamente con el vector (366,5 \pm 52,6 pg/mg; $P < 0,05$, FIG. 7A).

25

[0227] La proteína TNF- α no pudo detectarse en los homogeneizados de tumores de células PROb después de la inyección del vector Ad.Null.3511.11D y del tratamiento sistémico con NS o cisplatino. Sin embargo, se observó un aumento significativo (2,7 veces) en la proteína TNF- α tumoral después del tratamiento combinado con Ad.Egr.TNF.11D + cisplatino (878,6 \pm 61,9 pg/mg) en comparación con el tratamiento solamente con el vector (321,4 \pm 27,7 pg/mg; $P < 0,001$, FIG. 7B). Estos resultados demuestran la inducción de la proteína TNF- α por cisplatino *in vivo* y verifican que la proteína TNF- α es un producto del vector Ad.Egr.TNF.11D más que del tejido tumoral.

30

EJEMPLO 5

35 Ad.Egr.TNF.11D inducible por cisplatino mejora el tratamiento de xenoinjertos humanos y de rata.

[0228] Se examinaron los potenciales efectos antitumorales de la construcción quimioinducible Ad.Egr.TNF.11D y cisplatino en xenoinjertos de células Seg-1 y PROb. En los estudios de Seg-1 el volumen tumoral medio en el día 0 (inicio del tratamiento) fue de 381,3 \pm 10,8 mm³ (n = 48, 12 ratones por grupo de tratamiento). Los xenoinjertos recibieron inyecciones IT de Ad.Null.3511.11D o Ad.Egr.TNF.11D. Los ratones recibieron inyecciones IP de NS o cisplatino. Los tumores de control (Ad.Null.3511.11D + NS) duplicaron su tamaño en el día 4 y mostraron un aumento del volumen tumoral medio de 4,7 veces en el día 14. Un patrón de crecimiento similar se observó en los tumores tratados con el vector Ad.Egr.TNF.11D + NS (un aumento de 2,0 veces en el día 4 y un aumento del volumen tumoral medio de 3,8 veces en el día 14). Una regresión tumoral significativa se observó en los tumores que recibieron el tratamiento combinado con Ad.Egr.TNF.11D + cisplatino en comparación con los tumores tratados con el vector nulo + cisplatino en los días 4 ($P = 0,045$), 6 ($P < 0,005$), 8 ($P < 0,002$), 10 ($P < 0,001$), 12 ($P < 0,004$) y 14 ($P < 0,021$), (FIG. 8A).

40

45

[0229] En los estudios con PROb el volumen tumoral medio en el día 0 fue de 244,2 \pm 6,2 mm³ (n = 40, 10 ratones por grupo de tratamiento). Los tumores de control (Ad.Null.3511.11D + NS) crecieron continuamente y duplicaron su tamaño en el día 4, mostrando un aumento del volumen tumoral medio de 4,4 veces en el día 14. Un patrón de crecimiento similar se observó en tumores tratados con el vector Ad.Egr.TNF.11D + NS (un aumento de 1,6 veces en el día 4 y un aumento del volumen tumoral medio de 3,6 veces en el día 14). Una regresión tumoral significativa se observó en los tumores que recibieron el tratamiento combinado con Ad.Egr.TNF.11D + cisplatino en comparación con los tumores tratados con el vector nulo + cisplatino en los días 4 ($P = 0,045$), 6 ($P < 0,001$), 8 ($P = 0,048$), 10 ($P < 0,001$), 12 ($P < 0,001$) y 14 ($P = 0,002$), (FIG. 8B). En conjunto, estos datos apoyan una interacción antitumoral entre cisplatino y Ad.Egr.TNF.11D en xenoinjertos de origen humano o de roedor. Estos resultados son coherentes y están apoyados por la inducción de TNF- α por cisplatino observada en los experimentos *in vitro* e *in vivo*. Aunque se observó toxicidad después del tratamiento con cisplatino, no se observó una toxicidad adicional después del tratamiento combinado con cisplatino y Ad.Egr.TNF.11D.

50

60

[0230] Por lo tanto, el cisplatino, un agente quimioterapéutico empleado comúnmente que estimula la

producción de ROI, induce la producción de TNF- α en células cancerosas humanas y de roedor infectadas con un vector de adenovirus que codifica los elementos CArG del promotor Egr-1 ligados delante de un ADNc que codifica TNF- α . Se han observado efectos antitumorales significativos tanto de TNF- α como de cisplatino en ambos sistemas tumorales experimentales. Por lo tanto, la presente invención proporciona una nueva estrategia que combina el uso de agentes quimioterapéuticos, como cisplatino, con el control espacial y temporal de la terapia génica con el uso de genes antitumorales.

[0231] En el caso de los neoplasmas humanos más comunes, los tumores bien visibles no se tratan eficazmente con los agentes quimioterapéuticos más estándar. La estrategia de direccionamiento transcripcional, como la de Egr-1-TNF- α y cisplatino, es útil cuando es posible infundir o inyectar directamente en los tumores de gran tamaño, incluso en presencia de micrometástasis, ya que la combinación del vector y cisplatino es eficaz contra tumores de gran tamaño y el cisplatino contra la enfermedad metastásica. La inyección directa en los tumores deberá mejorarse con los avances recientes en el análisis de imágenes radiográficas de tumores, p. ej. barridos TEP, combinado con la reconstrucción de imágenes de TC. Además, los recientes desarrollos en el direccionamiento de vectores víricos a tumores pueden proporcionar una especificidad adicional a la terapia génica quimioinducible del cáncer metastásico.

J. Referencias

- 20 **[0232]**
 Patente de los EE. UU. 4.664.911
 Patente de los EE. UU. 4.684.611
 Patente de los EE. UU. 4.792.447
 Patente de los EE. UU. 4.797.368
 25 Patente de los EE. UU. 4.952.500
 Patente de los EE. UU. 5.045.451
 Patente de los EE. UU. 5.139.941
 Patente de los EE. UU. 5.302.523
 Patente de los EE. UU. 5.322.783
 30 Patente de los EE. UU. 5.354.855
 Patente de los EE. UU. 5.359.046
 Patente de los EE. UU. 5.384.253
 Patente de los EE. UU. 5.464.765
 Patente de los EE. UU. 5.538.877
 35 Patente de los EE. UU. 5.538.880
 Patente de los EE. UU. 5.550.318
 Patente de los EE. UU. 5.563.055
 Patente de los EE. UU. 5.578.706
 Patente de los EE. UU. 5.580.859
 40 Patente de los EE. UU. 5.589.466
 Patente de los EE. UU. 5.591.616
 Patente de los EE. UU. 5.610.042
 Patente de los EE. UU. 5.656.610
 Patente de los EE. UU. 5.686.072
 45 Patente de los EE. UU. 5.702.932
 Patente de los EE. UU. 5.736.524
 Patente de los EE. UU. 5.767.072
 Patente de los EE. UU. 5.780.448
 Patente de los EE. UU. 5.925.565
 50 Patente de los EE. UU. 5.935.819
 Patente de los EE. UU. 5.945.100
 Patente de los EE. UU. 5.981.274
 Patente de los EE. UU. 5.994.136
 Patente de los EE. UU. 5.994.624
 55 Patente de los EE. UU. 6.013.516

Arap y col., Cancer Res., 55: 1351-1354, 1995.

Ausubel y col., en: Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley and Sons, Inc., 1994.

Baichwal y Sugden, en: Gene Transfer, Kucherlapati R, ed., Nueva York, Plenum Press, págs. 117-148, 1986.

60 Bajorin y col., Proc. Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol., 7: A967, 1988.

Bedzyk y col., J. Biol. Chem., 265: 18615, 1990.

Blomer y col., J. Virol. 71(9): 6641-6649, 1997.

- Bonavida y col., *Gynecol. Oncol.*, 38: 333-9, 1990.
 Burbage y col., *Leuk. Res.*, 21(7): 681-690, 1997.
 Bussemakers y col., *Cancer Res.*, 52: 2916-2922, 1992.
 Caldas y col., *Nat. Genet.*, 8: 27-32, 1994.
- 5 Carbonelli y col. *FEMS Microbiol. Lett.* 177(1): 75-82, 1999.
 Casey y col., *Oncogene*, 6: 1791-1797, 1991.
 Chandler y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8): 3596-3601, 1997.
 Chaudhary y col. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 9491,1990.
 Chen and Okayama, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 2745-2752, 1987.
- 10 Cheng y col., *Cancer Res.*, 54: 5547-5551, 1994.
 Cheung y col., *Arch. Biochem. Biophys.*, 305(2): 563-569,1993.
 Cocea, *Biotechniques*, 23: 814-816, 1997.
 Cotten y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(13): 6094-6098, 1992.
 Coupar y col., *Gene*, 68: 1-10, 1988.
- 15 Curiel, en: *Viruses in Human Gene Therapy*, J.-M.H. Vos (ed.), Carolina Academic Press, Durham, NC, EE. UU. págs. 179-212,1994.
 Datta y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2419-22, 1993.
 Davis y col., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 296: 1-6, 2001.
 Demetri y col., *J. Clin. Oncol.*, 7: 1545-53, 1989.
- 20 Duan y col., *J. Neurooncol.*, 52: 23-36, 2001.
 Edelman y Crossin, *Annu. Rev. Biochem.*, 60: 155-190, 1991.
 Edelman, *Annu. Rev. Biochem.*, 54: 135-169, 1985.
 Fechheimer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8463-8467, 1987.
 Fiers, *FEBS Letters*, 285(2): 199-212, 1991.
- 25 Forster y Symons, *Cell*, 49: 211-220, 1987.
 Fraley y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3348-3352, 1979.
 Friedmann, *Science*, 244: 1275-1281,1989.
 Frixen y col., *J. Cell Biol.*, 113: 173-185, 1991.
 Gerlach y col., *Nature (Londres)*, 328: 802-805, 1987
- 30 Ghosh y Bachhawat, en: *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands*, (Wu G, Wu C ed.), Nueva York: Marcel Dekker, págs. 87-104,1991.
 Giancotti y Ruoslahti, *Cell*, 60: 849-859, 1990.
 Gonzalez-Zulueta y col., *Cancer Research*, 55(20): 4531-4535, 1995.
 Goodbourn y Maniatis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 1447, 1988.
- 35 Gopal, *Mol. Cell. Biol.*, 5: 1188-1190,1985.
 Gorczyca y col., *Cancer Res.*, 53: 1945-1951, 1993.
 Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52: 456-467, 1973.
 Grunhaus y Horwitz, *Seminar in Virology*, 3: 237-252, 1992.
 Hall, *Radiobiology for the Radiologist*, Harper and Row, 1988.
- 40 Hall, *Radiobiology for the Radiologist*, Harper and Row, 1994.
 Harland y Weintraub, *J. Cell. Biol.*, 101: 1094-1099,1985.
 Havell y col., *J. Exp. Med.*, 167: 1067-85, 1988.
 Herman y col., *Cancer Research*, 55(20): 4525-4530, 1995.
 Hollstein y col., *Science*, 253: 49-53, 1991.
- 45 Horwich y col. *J. Virol.*, 64: 642-650, 1990.
 Hussussian y col., *Nature Genetics*, 15-21, 1994.
 Inouye y col., *Nucl. Acids Res.*, 13: 3101-3109, 1985.
 Irie y Morton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8694-8698, 1986
 Johnson y Stevenson, en: *Cancer Principles and Practice of Oncology* (ed. DeVita, V.T., Hellman y Rosenberg,) 376-88, 2001.
- 50 Joyce, *Nature*, 338: 217-244, 1989.
 Kamb y col., *Nature Genetics*, 8: 22-26, 1994.
 Kamb y col., *Science*, 267: 436-440, 1994.
 Kaneda y col., *Science*, 243: 375-378, 1989.
- 55 Kartalou y Essigmann, *Mutat. Res.*, 478: 23-43, 2001.
 Kato et al, *J. Biol. Chem.*, 266: 3361-3364, 1991.
 Kelleher y Vos, *Biotechniques*, 17(6): 1110-1117, 1994.
 Kim y Cook, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8788-8792, 1987.
 Kucuk y col., *Am. J. Clin. Oncol.*, 23: 371-5, 2000.
- 60 Levenson y col., *Human Gene Therapy*, 9: 1233-1236, 1998.
 Lebkowski y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8(10): 3988-3996, 1988.
 Lidor y col., *Am. J. Obstet. Gynecol.*;177(3): 579-585, 1997.

- Lin y Guidotti, *J. Biol. Chem.*, 264: 14408-14414, 1989.
 Laughlin y col., *J. Virol.*, 60(2): 515-524, 1986.
 McLaughlin y col., *J. Virol.*, 62(6): 1963-1973, 1988.
 Macejak y Sarnow, *Nature*, 353: 90-94, 1991.
- 5 Mann y col., *Cell*, 33: 153-159, 1983.
 Massuda y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(26): 14701-14706, 1997.
 Matura y col., *Brit. J. Cancer*, 66: 1122-1130, 1992.
 Mauceri y col., *Int. J. Cancer*, 97: 410-5, 2002.
 Merlo y col., *Nat. Med.*, (7): 633-4, 1995.
- 10 Michel and Westhof, *J. Mol. Biol.*, 216: 585-610, 1990.
 Miksicek y col., *Cell*, 46: 203, 1986.
 Mizukami y col., *Virology*, 217: 124-130, 1996.
 Mori y col., *Cancer Res.*, 54: 3396-3397, 1994.
 Morton y Ravindranath, en: *Tumor Immunology*, Dalglish (ed.), Londres: Cambridge University Press, 1-55, 1996.
- 15 Morton y col., *Ann. Surg.*, 216: 463-482, 1992.
 Muzyczka, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158: 97-129, 1992.
 Myers, EPO 0273085.
 Nabel y col., *Science*, 244: 1342-1344, 1989.
 Nakamoto y col., *Anticancer Res.*, 20: 4087-96, 2000.
- 20 Naldini y col., *Science*, 272(5259): 195, 1996
 Nicolas y Rubenstein, en: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez y Denhardt (eds.), Stoneham: Butterworth, págs. 493-513, 1988.
 Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721: 185-190, 1982.
 Nicolau y col., *Methods Enzymol.*, 149: 157-176, 1987.
- 25 Nobri y col., *Nature*, 368: 753-756, 1995.
 Obrador y col., *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2: 119-30, 2001.
 Obrink, *BioEssays*, 13: 227-233, 1991.
 Odin y Obrink, *Exp. Cell. Res.*, 171: 1-15, 1987.
 Okamoto y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 11045-11049, 1994.
- 30 Old, *Science*, 230: 630-2, 1985.
 Omirulleh y col., *Plant Mol. Biol.*, 21: 415-28, 1993.
 Orlow y col., *Cancer Res.*, 54: 2848-2851, 1994.
 Paskind y col., *Virology*, 67: 242-248, 1975.
 PCT 94/09699
- 35 PCT 95/06128
 Pelletier y Sonenberg, *Nature*, 334: 320-325, 1988.
 Perales y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4086-4090, 1994.
 Potrykus y col., *Mol. Gen. Genet.*, 199: 183-188, 1985.
 Potter y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 7161-7165, 1984.
- 40 Ravindranath y Morton, *Intern. Rev. Immunol.*, 7: 303-329, 1991.
 Reinhold-Hurek y Shub, *Nature*, 357: 173-176, 1992.
 Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 15^a ed., págs. 1035-1038 y 1570-1580.
 Ridgeway, en: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez RL, Denhardt DT, ed., Stoneham: Butterworth, págs. 467-492, 1988.
- 45 Rippe y col., *Mol. Cell. Biol.*, 10: 689-695, 1990.
 Robaye y col., *Am. J. Pathol.*, 138: 447-53, 1991.
 Rosenberg, P., *Autotransfusion (editorial)"Duodecim.*, 106 (14): 1027-9, 1990.
 Roux y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9079-9083, 1989.
 Sarver y col., *Science*, 247: 1222-1225, 1990.
- 50 Scanlon y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 10591-10595, 1991.
 Serrano y col., *Nature*, 366: 704-707, 1993.
 Serrano y col., *Science*, 267: 249-252, 1995.
 Slungaard y col., *J. Exp. Med.*, 171: 2025-41, 1990.
 Smith y Rutledge, *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 42: 169-172, 1975.
- 55 Spriggs y col., *J. Natl. Cancer Inst.*, 80: 1039-44, 1988.
 Staba y col., *Gene Therapy*, 5: 293-300, 1998.
 Takahashi y col., *Cancer Res.*, 52: 734-736, 1992.
 Tartaglia y col., *Cell*, 74: 845-53, 1993.
 Temin, en: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986.
- 60 Thom y col., *J. Clin. Oncol.*, 13: 264-73, 1995.
 Tratschin y col., *Mol. Cell. Biol.*, 4: 2072-2081, 1984.
 Tur-Kaspa y col., *Mol. Cell. Biol.*, 6: 716-718, 1986.

- Umbas y col., *Cancer Res.*, 52: 5104-5109, 1992.
Wagner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(9): 3410-3414, 1990.
Watanabe y col., *Cancer Res.*, 48: 2179-83, 1988.
Weichselbaum y col., *Acta Oncol.*, 40, 735-8, 2001.
- 5 Weichselbaum y col., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 30: 229-34, 1994.
Weinberg, *Science*, 254: 1138-1145, 1991.
Wilson y col., *Science*, 244: 1344-1346, 1989.
Wong y col., *Gene*, 10: 87-94, 1980.
Wu y Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12: 159-167, 1993.
- 10 Wu y Wu, *Biochem.*, 27: 887-892, 1988.
Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432, 1987.
Young y col., *N. Engl. J. Med.* 7: 299(23): 1261-1266, 1978.
Zufferey y col., *Biotechnol.*, 15(9): 871-875, 1997.

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión en combinación con al menos un compuesto inductor de radicales libres que daña el ADN para uso en terapia, en que dicho vector de expresión comprende un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína de interés y dicho segmento de ácido nucleico está colocado bajo el control de un promotor Egr-1, con lo que dicho compuesto que daña el ADN induce la expresión de dicha proteína de interés a partir de dicho promotor Egr-1 en una célula,
- 5 en que dicho compuesto inductor de radicales libres que daña el ADN se selecciona del grupo que consta de un compuesto de platino, cisplatino, mostaza nitrogenada, Cytoxan, ciclofosfamida, mitomicina C, ifosfamida, bleomicina, actinomicina, carboplatino, busulfán, bcnu, ccnu, hexametilmelamina, oxaliplatino, mitoxantrona, 5-fluorouracilo, gemcitabina y paclitaxel.
- 10 2. La combinación de la reivindicación 1, en que dicho vector de expresión está además en combinación con al menos un segundo compuesto inductor de radicales libres que daña el ADN.
- 15 3. La combinación de la reivindicación 1, en que dicho vector de expresión está además en combinación con un compuesto quimioterapéutico para el cáncer.
- 20 4. La combinación de la reivindicación 1, en que dicha célula es una célula cancerosa.
5. La combinación de la reivindicación 4, en que dicha célula cancerosa es una célula de cáncer de pulmón, una célula de cáncer próstata, de una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer testicular, una célula de cáncer de cerebro, una célula de cáncer de piel, una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer gástrico, una célula de cáncer esofágico, una célula de cáncer de tráquea, una célula de cáncer de cabeza y cuello, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de hígado, una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer linfóide, una célula de leucemia, una célula de cáncer de cérvix o una célula de cáncer de vulva.
- 25 6. La combinación de la reivindicación 1, en que dicho vector de expresión comprende además una señal de poliadenilación ligada operativamente a dicho segmento de ácido nucleico.
- 30 7. La combinación de la reivindicación 1, en que dicho vector de expresión es un vector vírico.
- 35 8. La combinación de la reivindicación 7, en que dicho vector vírico es un vector de adenovirus, un vector del virus adenoasociado, un vector de retrovirus, un vector del virus de la vacuna o un vector del virus del herpes.
9. La combinación de la reivindicación 7, en que dicho vector vírico carece de uno o más genes víricos, lo que hace que el vector vírico no pueda replicarse.
- 40 10. La combinación de la reivindicación 1, en que dicha proteína de interés es un supresor tumoral, un inductor de apoptosis, una enzima, una citocina o una toxina.
11. La combinación de la reivindicación 10, en que dicha enzima es timidina-cinasa, citosina-desaminasa, hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa.
- 45 12. La combinación de la reivindicación 10, en que dicha citocina es TNF- α .
13. La combinación de la reivindicación 1 para el tratamiento de un humano.
- 50 14. El uso de un vector de expresión que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica para el cáncer, en que dicho segmento de ácido nucleico está colocado bajo el control de un promotor Egr-1, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa en un sujeto; en que dicho tratamiento comprende la administración de dicho vector de expresión a dicho sujeto en combinación con un compuesto inductor de radicales libres que daña el ADN, con lo que dicho compuesto que daña el ADN induce la expresión de dicha proteína terapéutica para el cáncer a partir de dicho promotor Egr-1, y de este modo se trata dicha enfermedad hiperproliferativa en dicho sujeto,
- 55 y en que el compuesto inductor de radicales libres que daña el ADN se selecciona del grupo que consta de un compuesto de platino, cisplatino, mostaza nitrogenada, Cytoxan, ciclofosfamida, mitomicina C, ifosfamida, bleomicina, actinomicina, carboplatino, busulfán, bcnu, ccnu, hexametilmelamina, oxaliplatino, mitoxantrona, 5-fluorouracilo, gemcitabina y paclitaxel.
- 60

15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, en que dicha enfermedad hiperproliferativa es cáncer.
16. El uso de la reivindicación 14, en que dicho vector de expresión es adecuado para administración local
5 o regional a un tumor localizado en dicho sujeto.
17. El uso de la reivindicación 14, en que dicho vector de expresión es adecuado para administración
sistémica.
- 10 18. El uso de la reivindicación 14, en que dicho vector de expresión es adecuado para administración por
medio de una inyección intratumoral o por inyección directa en la vasculatura tumoral.
19. El uso de la reivindicación 14, en que dicho vector de expresión es para administración después de
dicho compuesto que daña el ADN o antes que dicho compuesto que daña el ADN.
- 15 20. El uso de la reivindicación 14, en que dicho vector de expresión y dicho compuesto que daña el ADN
son para administración simultánea.
21. El uso de la reivindicación 14, en que dicho tratamiento comprende la administración de dicho vector
20 de expresión al menos dos veces.
22. El uso de la reivindicación 14, en que dicho tratamiento comprende la administración de dicho
compuesto que daña el ADN al menos dos veces.
- 25 23. El uso de la reivindicación 14, en que dicho medicamento es para la inhibición del crecimiento tumoral,
para la destrucción de una célula tumoral, para la inhibición de la metástasis de células tumorales, para la reducción
de la carga tumoral o para hacer operable un tumor inoperable en dicho sujeto.
- 30 24. El uso de la reivindicación 14, en que la proteína terapéutica para el cáncer es TNF- α .

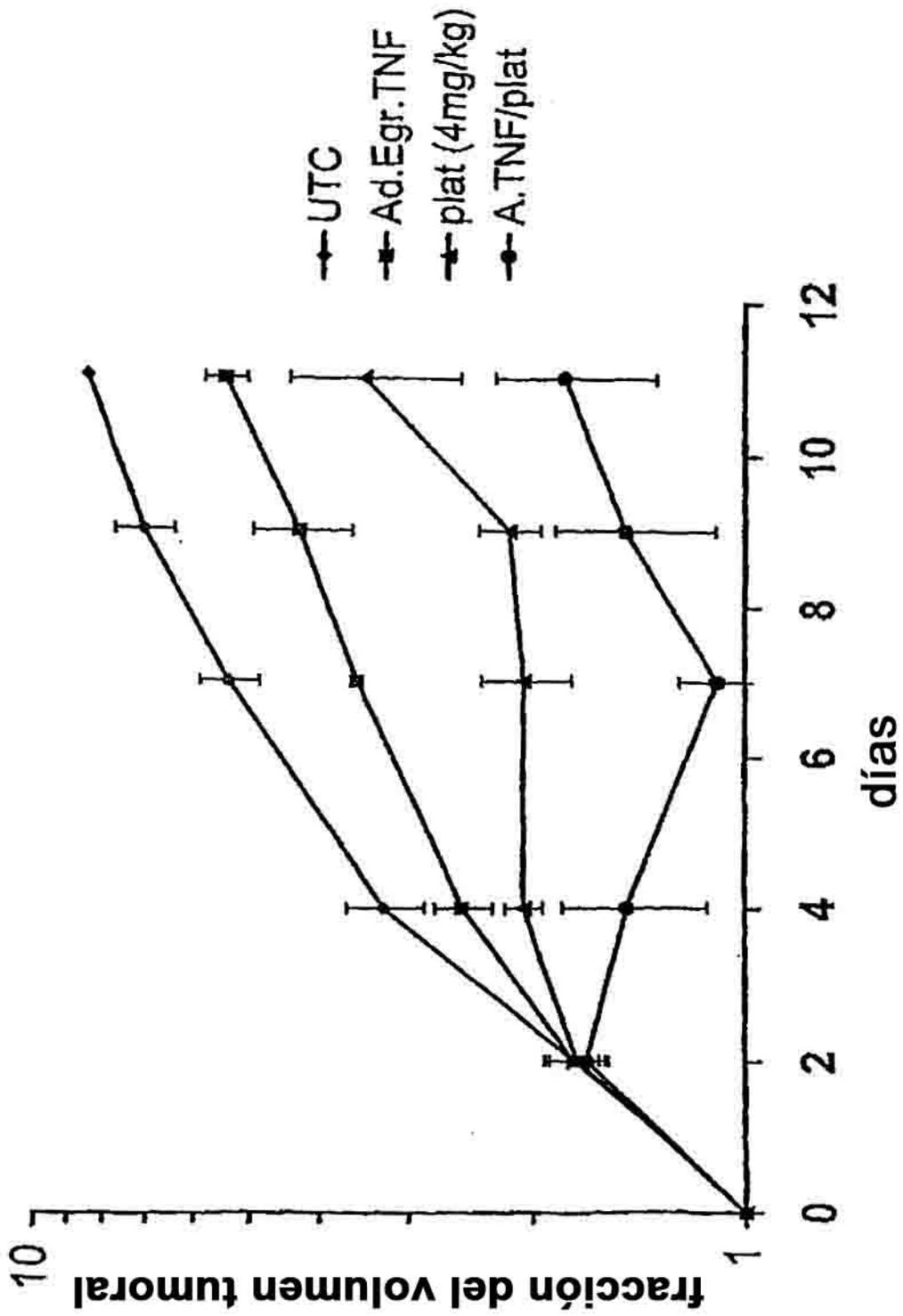


FIG. 1

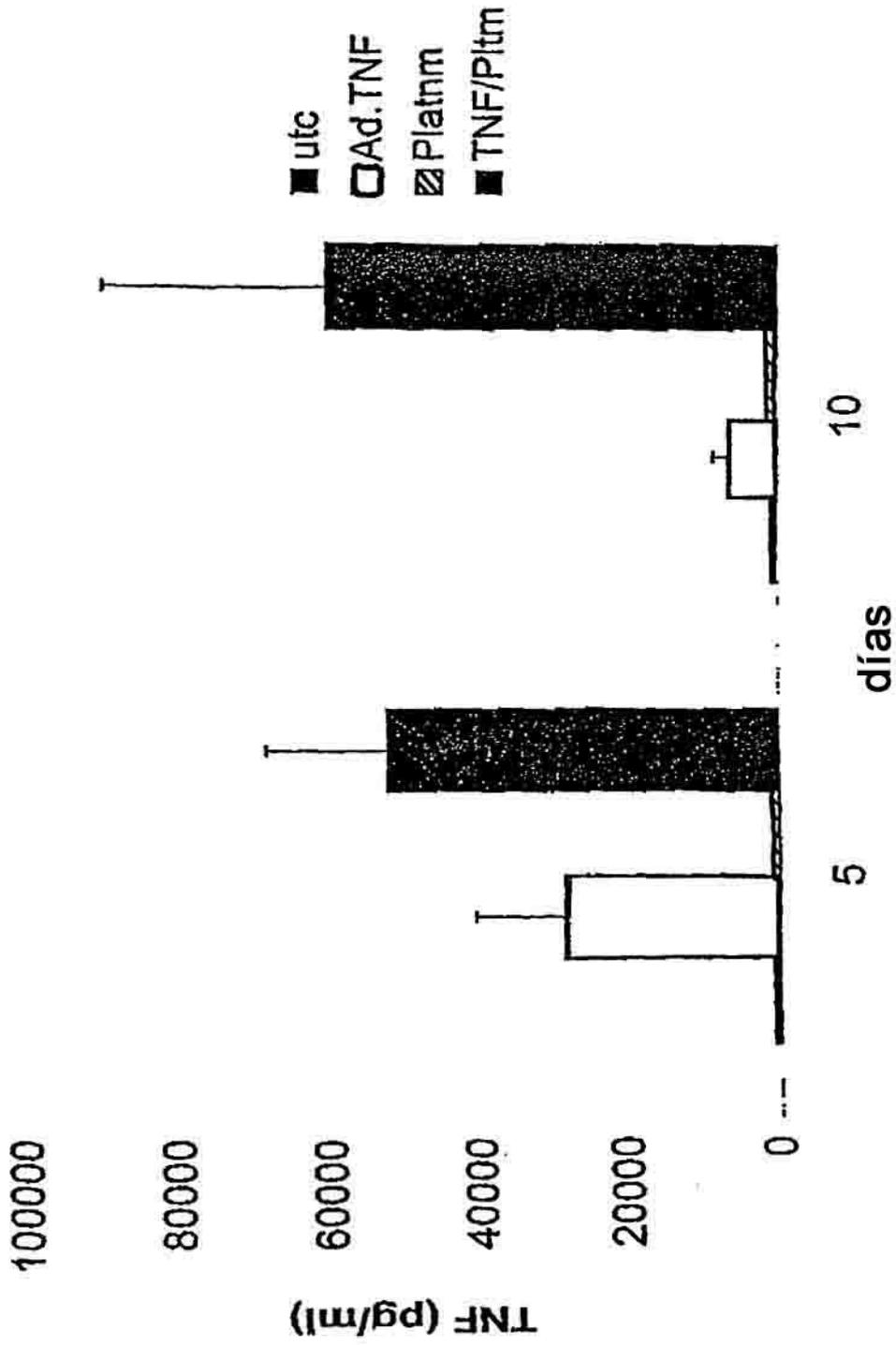


FIG.2

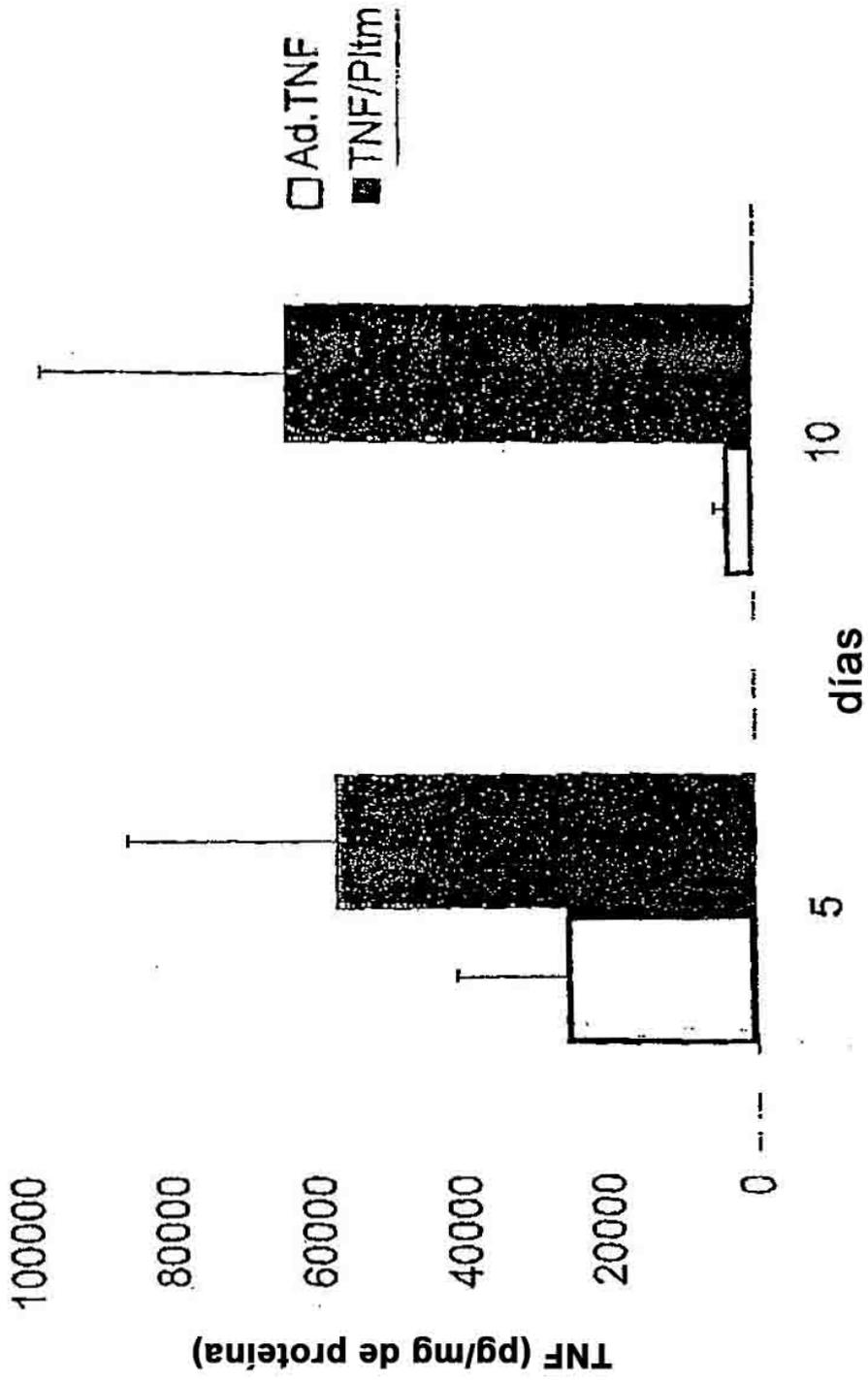


FIG. 3

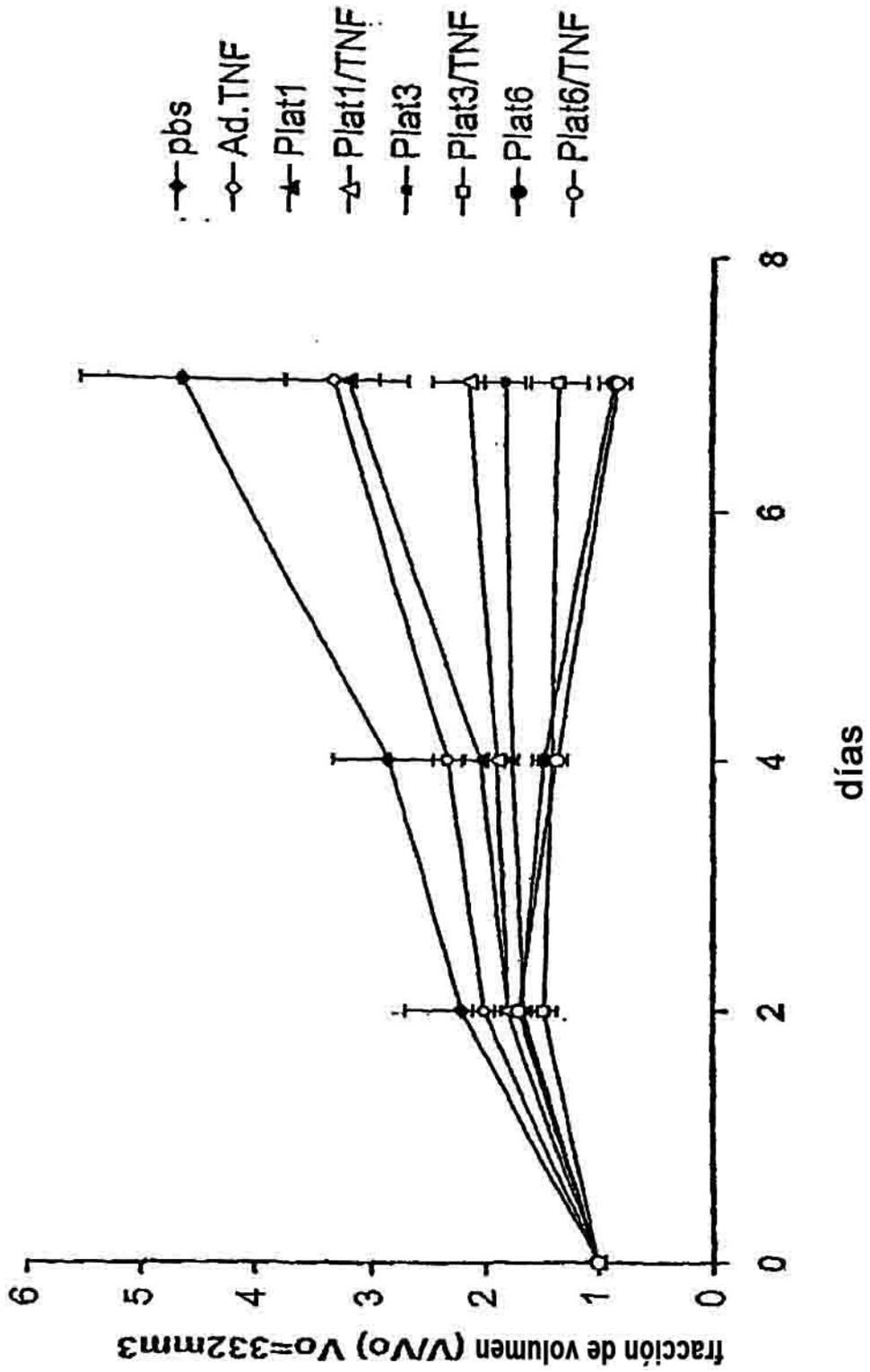


FIG. 4

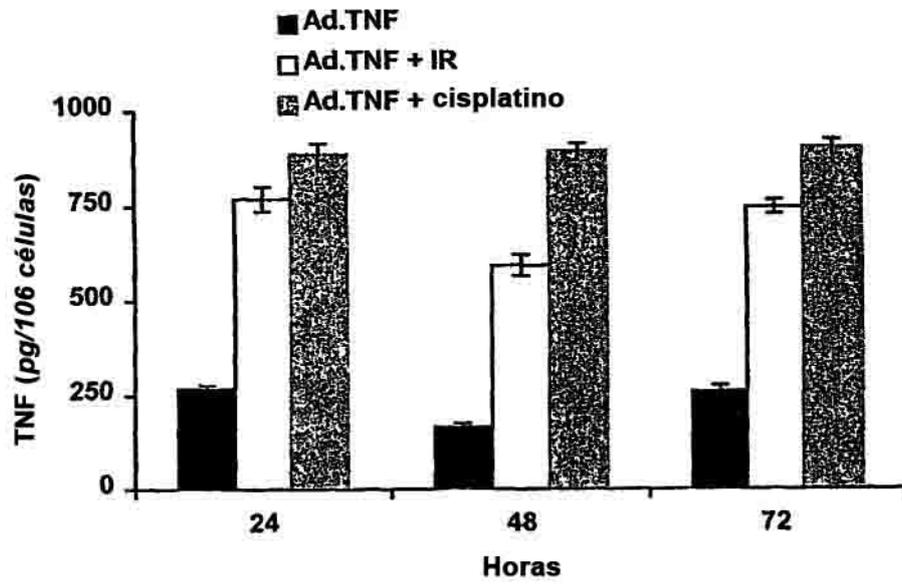


FIG. 5A

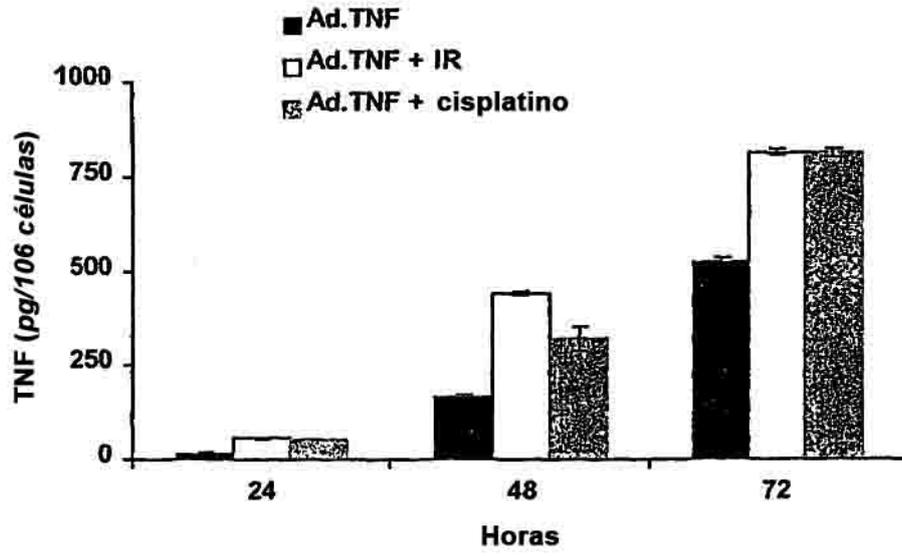


FIG. 5B

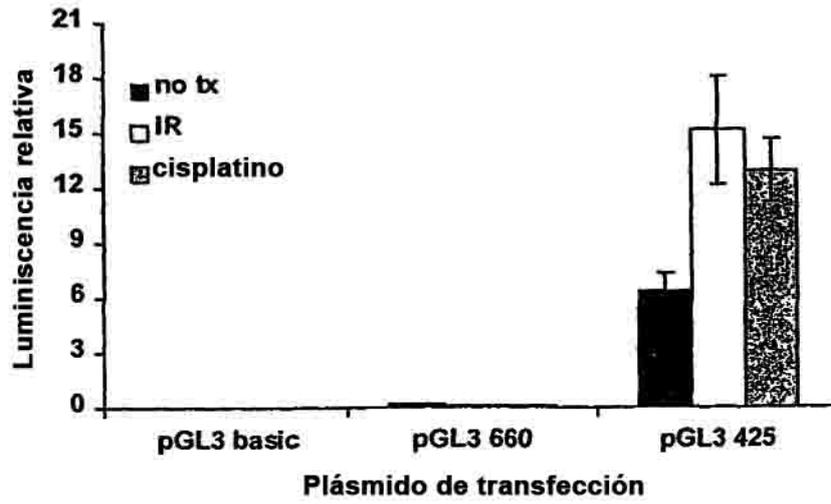


FIG. 6A

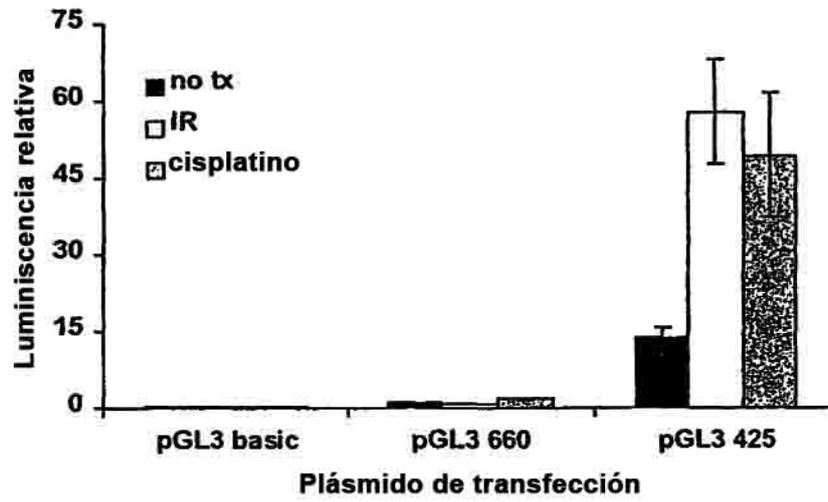


FIG. 6B

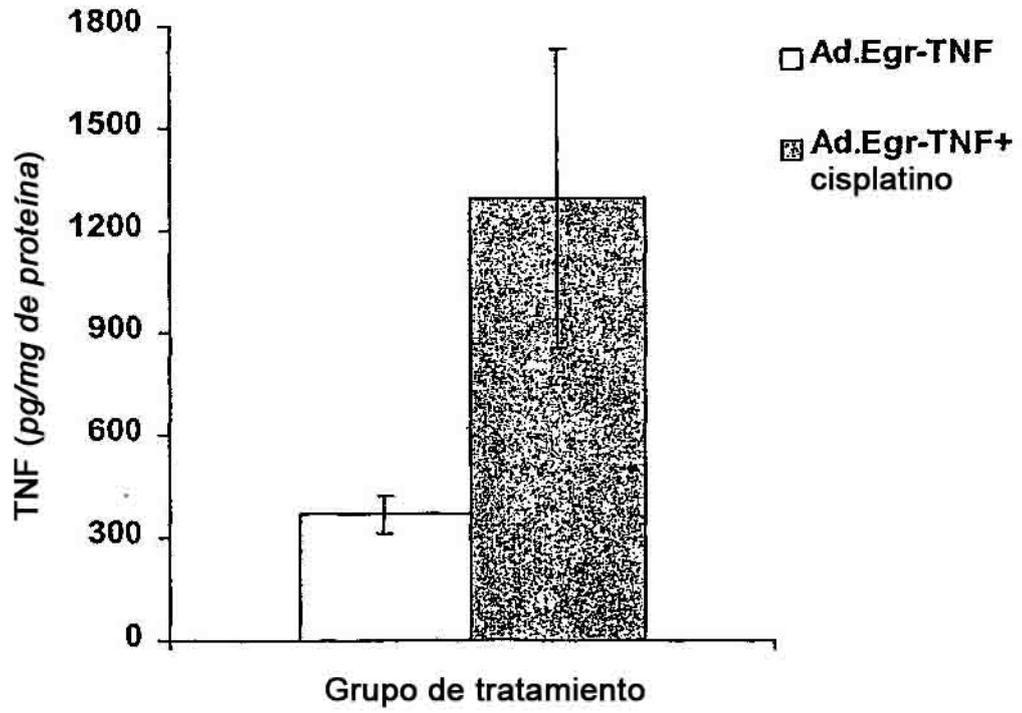


FIG. 7A

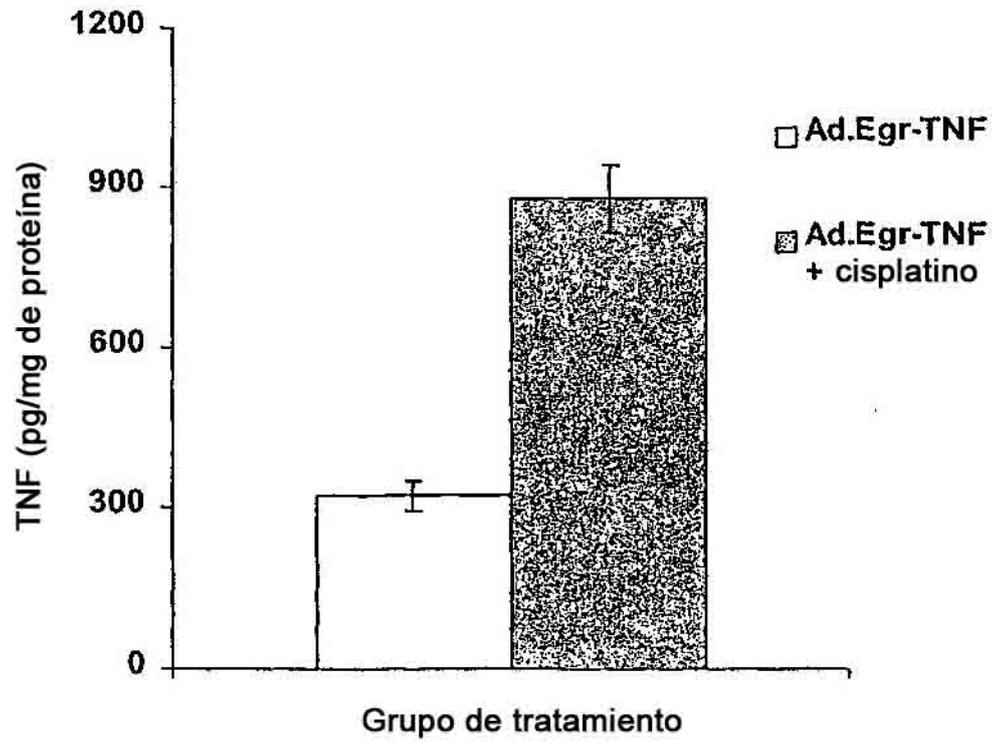


FIG. 7B

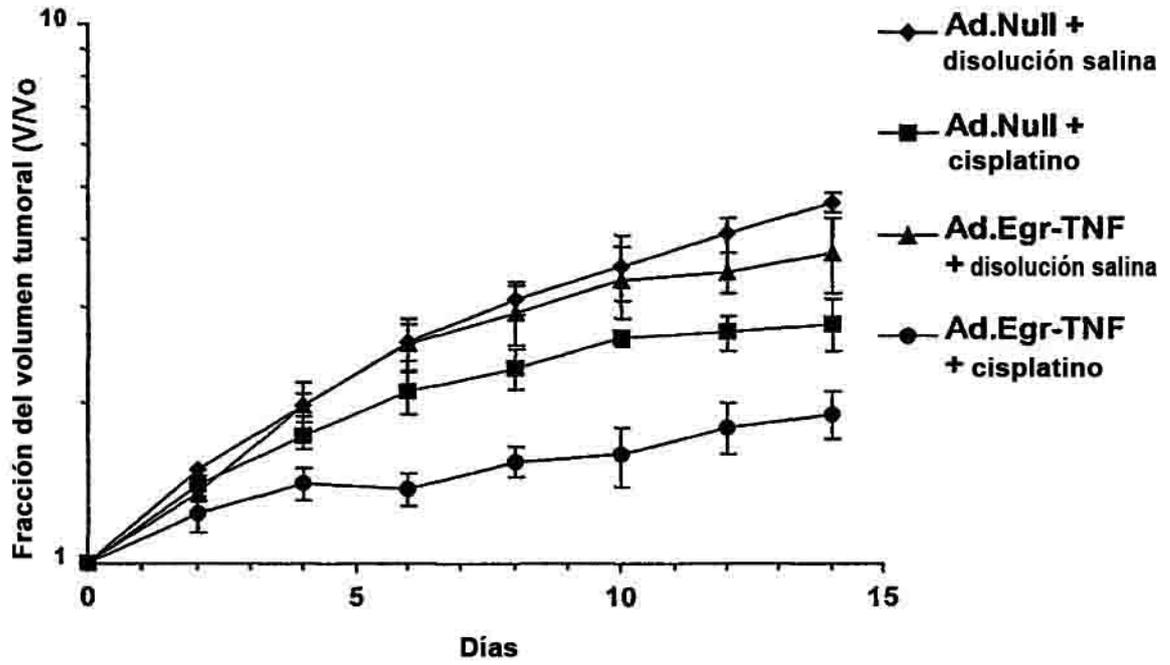


FIG. 8A

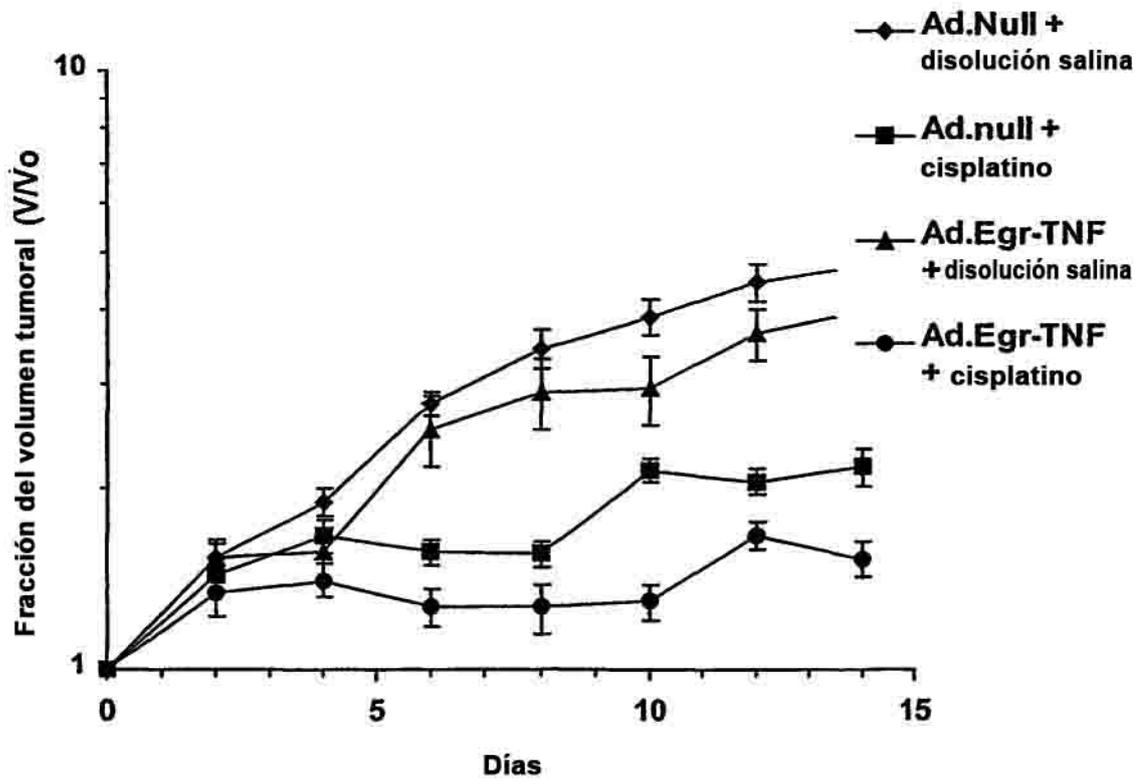


FIG. 8B