

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 107**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/87** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A01N 43/04** (2006.01)  
**A61K 31/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05851858 .0**  
96 Fecha de presentación: **17.11.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1827101**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

54 Título: **Combinación de inmunogenoterapia y quimioterapia para el tratamiento del cáncer y enfermedades hiperproliferativas**

30 Prioridad:  
**09.12.2004 US 635042 P**  
**28.10.2005 US 261931**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**08.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**08.05.2012**

73 Titular/es:  
**Egen, Inc.**  
**601 Genome Way, Suite 3100**  
**Huntsville, AL 35806, US**

72 Inventor/es:  
**FEWELL, Jason, G.;**  
**MATAR, Majed;**  
**RICE, Jennifer;**  
**LEWIS, Danny, H. y**  
**ANWER, Khursheed**

74 Agente/Representante:  
**de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 380 107 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

Combinación de inmunogenoterapia y quimioterapia para el tratamiento del cáncer y enfermedades hiperproliferativas

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un ácido nucleico, un polímero de administración de genes y por lo menos un fármaco quimioterapéutico complementario para el tratamiento de cáncer o trastornos hiperproliferativos en mamíferos. La presente invención también se refiere a métodos para tratar cáncer o trastornos hiperproliferativos en mamíferos, donde dicho método comprende poner en contacto células cancerosas o cualquier otra célula hiperproliferativa con dichas composiciones por inyección intratumoral, intraperitoneal o sistémica.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El cáncer es la causa más frecuente de muerte en muchas partes del mundo, y cada año se diagnostican más de 2,5 millones de casos a nivel global. Los últimos avances en la comprensión de la biología molecular del cáncer han demostrado que el cáncer es una enfermedad genética que produce la proliferación anormal de la célula afectada. Por lo tanto, los terapeutas de cáncer se centran ahora en estrategias terapéuticas que implican macromoléculas que portan información genética, en lugar de una proteína terapéutica propiamente dicha, lo que permite que los genes suministrados de manera exógena se expresen en el entorno tumoral. Se cree que la genoterapia ofrece beneficios terapéuticos a los pacientes enfermos de cáncer en una diversidad de formas que no son posibles con los planteamientos convencionales. Los fármacos de moléculas pequeñas tradicionales usualmente funcionan por interacción no específica con las dianas celulares, producen efectos colaterales indeseables y no tratan la raíz de la enfermedad. Los fármacos de proteínas que se han introducido en los últimos años tienen sus propias limitaciones debido a su rápida degradación y a las altas dosis requeridas que con frecuencia provocan efectos colaterales no deseados. El tratamiento génico utiliza el mecanismo celular del propio organismo para producir niveles terapéuticos sostenidos de proteínas en tejidos y células específicos después de una única inyección, proporcionando así un método de tratamiento seguro y eficaz con mejor cumplimiento por parte del paciente.

25 Las estrategias de genoterapia para el cáncer frecuentemente aplicadas incluyen inmunoterapia, ablación celular y anti-angiogénesis que se logra con inyección 1) local, 2) loco-regional, o 3) sistémica. La inmunoterapia para el cáncer es un planteamiento potente para combatir el cáncer estimulando el sistema inmunitario contra las células cancerosas. Las inmunocitocinas desempeñan una función importante en el desarrollo de respuestas inmunitarias hospedantes por activación, maduración y diferenciación de las células inmunitarias. Se han ensayado varias citocinas contra una diversidad de tipos de cáncer en modelos humanos y animales de cáncer. Véanse *Hum Gene Ther.*, 1998, vol. 9, 2223; *Gene Ther.* 1999, vol. 6, 833; *Cancer Gene Ther.* 2000, vol. 7, 1156; *J. Control Rel.* 2003, vol. 87,177; y *Cancer Res.*, 2002, vol. 62, 4023. La interleucina 12 (IL-12) es una citocina inmunoestimuladora que parece ser prometedora en el tratamiento de cáncer humano. Véase *The Oncologist*, 1996, vol. 1, 88.

35 La IL-12 es un heterodímero de 70-kD que consiste en dos cadenas covalentemente unidas, p35 y p40. Los efectos biológicos de IL-12 incluyen la inducción de la producción de IFN- $\gamma$  tanto por células T CD4+ en reposo como activadas, células T CD8+ y linfocitos citolíticos naturales (NK). La IL-12 también potencia la proliferación de células T activadas y células NK, aumenta la actividad lítica de NK/linfocitos citotóxicos activados por linfocinas, y facilita las respuestas de los linfocitos T citotóxicos (CTL) específicas.

40 En modelos animales, se ha demostrado que la IL-12 recombinante induce profundos efectos antitumorales mediados por las células T que causan regresión de tumores consolidados, seguida de memoria inmunitaria sistémica. Véase *The Oncologist*, 1996, vol. 1, 88. No obstante, la administración sistémica de IL-12 recombinante ha provocado toxicidad limitante de la dosis en varios ensayos experimentales y en un ensayo humano inicial. Véanse *Lab Invest.*, 1994, vol. 71, 862; *Science*, 1995, vol. 270, 908; *J. Interferon Cytokine Res.*, 1995, vol. 14, 335. La toxicidad limitante de la dosis también se observó con la administración intraperitoneal de IL-12 recombinante en un ensayo clínico humano reciente. *Clin. Cancer Res.*, 2002, vol. 8, 3686. Un planteamiento de administración de genes que pudiese proveer niveles terapéuticos de IL-12 localmente en el sitio del tumor tendría la ventaja de generar una respuesta anticancerosa sin causar toxicidad sistémica.

45 Ambos sistemas de administración de genes víricos y no víricos se han utilizado para la administración de genes de IL-12 en modelos animales de cáncer. El planteamiento vírico tiene serias limitaciones prácticas debido a las preocupaciones de toxicidad, principalmente a causa de un aumento en la incidencia del cáncer y una fuerte reacción inmunitaria a los antígenos víricos por el sistema hospedante. Existe un considerable interés en el desarrollo de sistemas de administración de genes no víricos debido a su toxicidad inferior. Se ha demostrado el uso de polivinilpirrolidona (PVP), un sistema de administración de genes no vírico, para la administración de IL-12 para tratar carcinoma renal (Renca) y carcinoma de células de colon (CT26). Véase *Gene Ther.*, 1999, vol. 6, 833. Cuando los tumores se sometieron a esta genoterapia, exhibieron todas las características de la terapia de proteínas de IL-12, p. ej., un aumento en la infiltración de NK, células T CD4 y CD8, unido a un aumento en la expresión de moléculas de clase I del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). La administración de genes de IL-12 se toleró bien y fue

altamente eficaz en animales que portaban tanto tumores Renca como CT26. Los ratones que rechazaron el tumor también estuvieron protegidos contra una re-exposición subsiguiente, lo que indica la presencia de una inmunidad sistémica a largo plazo. Se ha ensayado un lipopolímero soluble en agua (OSLO) funcionalizado y menos tóxico para administración del gen de IL-12 a tumores de carcinoma de colon CT26. Véase Mahato et al, *Mol. Ther.*, 2001, vol. 4, 130. El tratamiento con el plásmido de IL-12 (pIL-12) y el WSLP (pIL-12/WSLP) produjo niveles superiores de expresión de genes intratumorales que el DNA desnudo.

Asimismo, los efectos secundarios de la producción de citocinas IL-12, a saber niveles de IFN- $\gamma$  y óxido nítrico (NO) también fueron superiores en tumores tratados con WSLP en comparación con DNA desnudo. Una sola inyección de complejos pIL-12/WSLP produjo efectos subóptimos en el crecimiento del tumor y en la supervivencia animal, mientras que la administración repetida produjo mejor eficacia, lo que indica la administración suficiente por el sistema. *J. Control Release* 2003, vol. 87, 177. De modo similar, la inyección intratumoral del plásmido de IL-12 en otro vehículo polimérico, PAGA, produjo solamente inhibición parcial de tumores CT26. Véase *Gene Ther.*, 2002, vol. 9, 1075. Estos resultados garantizan la necesidad de sistemas de administración más eficientes. A pesar de sus insuficiencias en ensayos preclínicos anteriores, la excelente flexibilidad molecular de los vehículos de genes poliméricos permite la modificación compleja y la nueva funcionalización imperativa para el desarrollo de sistemas de administración de genes más eficientes.

Se reconoce ampliamente que empleando una estrategia de tratamiento individual contra el cáncer por lo general resulta ineficaz debido a la naturaleza multifactorial de esta enfermedad. La combinación de más de un fármaco para maximizar la respuesta anticáncer se utiliza cada vez más. Véase *Gene Ther.*, 2000, vol. 11, 1852. Se ha demostrado que existe una relación sinérgica entre la terapia de genes de IL-12 y la terapia de genes IFN- $\alpha$ . El co-tratamiento de tumores Renca con estos dos genes condujo a un rechazo del tumor de 100%, que fue mayor que aquel logrado con tratamientos o bien con IL-12 (58%) o IFN- $\alpha$  (25%) solos. De modo similar, los tumores CT26 demostraron un índice de rechazo de 50% con la genoterapia combinada, que fue mayor que el índice de rechazo de 17% y 0% logrado a partir de tratamientos individuales de IL-12 e IFN- $\alpha$ , respectivamente. Los tumores tratados con la terapia combinada demostraron una mayor infiltración del tumor en células NK y células T CD8 en comparación con tumores tratados por una monoterapia génica. La transferencia génica de metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT) en células madre, junto con quimioterapia, protegieron las células normales de la quimioterapia y redujeron la toxicidad sistémica de la quimioterapia. *Nature Reviews Cancer* 2004, vol. 4, 296.

Asimismo, la genoterapia combinada aumentó el número de moléculas CD40 en células que presenta antígenos (APC) en los tumores hasta niveles superiores que los logrados con tratamientos individuales. El incremento de CD40 en las APC se asocia con un estado de activación superior para la presentación de antígenos. Véanse *Nature*, 1998, vol. 393, 480; *Nature*, 1998, vol. 393, 474; y *Nature*, 1998, vol. 393, 478. Se observó un incremento similar en los niveles de mRNA para las quimiocinas IP-10 y TCA-3. La genoterapia combinada potenció, por ende, sinérgicamente la inmunidad antitumoral, y se halló que este efecto es duradero en estudios de re-exposición al tumor. Estudios de genoterapias combinadas similares han sido notificados por otros grupos. Véase *Laryngoscope* 2001, vol. 111, 815. Los tumores consolidados se trataron con pIFN- $\alpha$ /PVP, pIL-2/lípido o pIL-12/PVP solo, o sus combinaciones. La combinación de pIFN- $\alpha$ /PVP, comparada con otras dos terapias, incrementó significativamente los efectos antitumorales frente a los tratamientos individuales. En otro estudio que utilizó el mismo modelo de tumor, se demostró que el tratamiento combinado con pIL-12/PVP y pIL-2/lípido proporciona efectos antitumorales significativamente superiores en comparación con los tratamientos individuales. Véase *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg*, 2001, vol. 127, 1319.

En otro estudio, la inyección intratumoral de poliplejos de polietilimina lineal (PEI) con un anti-oncogén y un receptor de somatostatina de subtipo 2 (sst2), produjo una inhibición importante del desarrollo de tumores pancreáticos y metástasis en el hígado. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, vol.13, 128. La administración de sst2 mediada por PEI en tumores condujo a un aumento de la apoptosis y activación de las vías de caspasa-3 y poli(ADP-ribosa). La administración sostenida de poliplejos DNA/PEI a tumores sólidos produjo una mayor expresión que aquella obtenida por inyección en embolada. *Gene Ther.*, 1999, vol. 10, 1659. Se utilizaron dendrímeros para la inhibición de carcinoma pancreático y carcinoma hepatocelular por transferencia génica intratumoral de Fas-L y HSV-1 timidina cinasa, respectivamente. Véanse *Gene Ther.*, 2003, vol. 10, 434; y *Gene Ther.*, 2000, vol. 7, 53.

La quimioinmunoterapia que emplea fármacos citotóxicos y citocinas ofrece un nuevo planteamiento para mejorar el tratamiento de enfermedades neoplásicas. La eficacia terapéutica de las combinaciones de proteínas IL-12 con ciclofosfamida, paclitaxel, cisplatino o doxorubicina se ha investigado en el modelo de leucemia L1210 murino. Véase *Int. J. Cancer*, 1998, vol. 77, 720. El tratamiento de leucemia L1210 con IL-12 o uno de los agentes quimioterapéuticos anteriormente mencionados administrado solo produjo efectos antileucémicos moderados. La combinación de IL-12 con ciclofosfamida o paclitaxel no produjo aumento de los efectos antileucémicos en comparación con estos agentes administrados solos. No obstante, la combinación de IL-12 con doxorubicina aumentó el efecto antileucémico, mientras que la combinación con cisplatino tuvo un efecto mejorador moderado.

Sin embargo, en el modelo de melanoma murino MmB16, la combinación de IL-12 + paclitaxel fue más eficaz que las terapias individuales. *Cancer Lett.*, 1999, vol. 147, 67. También se examinó la eficacia antitumoral de la proteína IL-12 en combinación con adriamicina, ciclofosfamida o 5-FU en carcinoma de vejiga MB-49 y en melanoma B16. Véase,

*Clin. Cancer Res.*, 1997, vol. 3, 1661. En combinación con quimioterapia, la administración de IL-12 aumentó la actividad antitumoral sin causar toxicidad adicional. En sarcoma de ratón MCA207 resistente al tratamiento con IL-12 o ciclofosfamida, la combinación de IL-12 recombinante y ciclofosfamida produjo una mejor respuesta antitumoral que los tratamientos individuales. *J. Immunol.*, 1998, vol. 160, 1369. En tumores mamarios de ratones, la terapia combinada que comprendía quimioterapia de paclitaxel intravenoso y genoterapia de IL-12 antitumoral (IL-12/WSLP) fue más eficaz que las terapias individuales. Véase, *Molecular Therapy*, 2004, vol. 9, 829. El beneficio de esta terapia combinada dependió del vehículo de administración utilizado para el paclitaxel. Se observó la interacción sinérgica entre paclitaxel y la genoterapia de IL-12 cuando el paclitaxel se formuló en una formulación polimérica. En comparación, la combinación con Cremophor EL (Taxol®), una formulación de paclitaxel muy utilizada para la terapia del cáncer, no fue sinérgica, indicando que los beneficios observados eran específicos de la formulación.

Para lograr un resultado deseable a partir de un planteamiento de combinación que implica genoterapia, es importante la selección de un sistema de administración de genes apropiado. El sistema de administración de genes utilizado en los experimentos de combinación anteriormente mencionados (*Molecular Therapy*, 2004, vol. 9, 829) es un lipopolímero soluble en agua, PEI-Colesterol (WSP). En la presente invención, se describe el uso de una nueva clase de vehículos poliméricos (PEG-PEI-Colesterol) estructuralmente distinta de WSP en el sentido que contiene un polímero hidrófilo diseñado para mejorar la farmacocinética, seguridad y potencia del sistema de administración de genes y los ligandos de la membrana que interactúan (p. ej., colesterol) que se orientan en numerosas configuraciones geométricas para promover la actividad de transfección de los genes antineoplásicos o bien solos o en combinación con un agente quimioterapéutico. La ventaja de la actividad de transfección de PPC en comparación con WSP en tejidos de tumores se ilustra en la FIG. 1 y en la FIG. 2.

La combinación de dos agentes quimioterapéuticos o de un agente quimioterapéutico y una citosina se ha examinado clínicamente. Si bien estas combinaciones han producido mayor regresión tumoral, los beneficios de supervivencia a largo plazo son marginales, y la citotoxicidad ha representado un problema. Esto se debe a la toxicidad sistémica inherente con la quimioterapia y la terapia de proteínas recombinantes. Se deben diseñar planteamientos de combinaciones nuevas y más eficaces para mejorar la terapia del cáncer futura. En la presente invención, se describe un nuevo planteamiento de combinación para el tratamiento del cáncer, que comprende un agente terapéutico basado en ácido nucleico administrado con un vehículo polimérico y por lo menos un agente quimioterapéutico.

#### BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención provee composiciones farmacéuticas para el tratamiento de cáncer o trastornos hiperproliferativos, como se expone en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

Además, la invención provee composiciones según lo definido en las reivindicaciones 1 a 7 para uso en la inhibición del crecimiento y metástasis de células tumorales y para mejorar la supervivencia en mamíferos, mediante administración *in vivo*.

El ácido nucleico comprendido en las composiciones de la invención se puede seleccionar del grupo que consiste en DNA plasmídico, siRNA, RNA sentido, RNA antisentido y ribozimas. El DNA plasmídico puede ser un sistema de expresión de genes que contiene una secuencia de DNA que codifica una proteína antineoplásica o antiproliferativa seleccionada del grupo que consiste en interleucina-2, interleucina-4, interleucina-7, interleucina-12, interleucina-15, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$ , factor estimulante de colonias, factor estimulante de granulocitos y macrófagos, agentes antiangiogénicos, genes supresores de tumores, timidina cinasa, eNOS, iNOS; p53, p16, TNF- $\alpha$ , ligando Fas, oncogenes mutados, antígenos tumorales, antígenos víricos o antígenos bacterianos. El DNA plasmídico también puede codificar una molécula de shRNA diseñada para inhibir proteína(s) implicadas en el desarrollo o el mantenimiento de células tumorales u otras células hiperproliferativas. Un DNA plasmídico puede codificar simultáneamente una proteína terapéutica y uno o más shRNA. Asimismo, el ácido nucleico de dicha composición puede ser una mezcla de DNA plasmídico y RNA sintético, incluyendo RNA sentido, RNA antisentido o ribozimas.

El polímero de administración de genes es un lipopolímero que comprende polietilenimina (PEI), una cadena principal covalentemente unida a un polietilenglicol y a un colesterol. La polietilenimina puede además comprender un resto diana que incluye anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, receptores celulares, receptores del factor de crecimiento, receptores de citocinas, folato, transferrina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, asialoorosomucoide, manosa-6-fosfato (monocitos), manosa (macrófago, algunas células B), Lewis<sup>X</sup> y sialilo Lewis<sup>X</sup> (células endoteliales), N-acetil-lactosamina (células T), galactosa (células de carcinoma de colon) y trombomodulina (células endoteliales de pulmón de ratón), agentes fusogénicos tales como polimixina B y hemaglutinina HA2, agentes lisosomotróficos, señales de localización de núcleo (NLS) tales como antígeno T y similares.

En una realización preferida de la composición anterior, el agente farmacéutico es un fármaco quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en taxanos, platinos, adriamicinas, ciclofosfamida, topotecán, carmustina (BCNU) o sus combinaciones. Se prefieren particularmente paclitaxel, carboplatino, topotecán, gemcitabina y cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida de las composiciones anteriores, el agente farmacéutico es un anticuerpo antineoplásico seleccionado del grupo que consiste en anticuerpo CD20, anticuerpo HER2/neu, anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo del receptor del factor de crecimiento epidérmico y sus conjugados radioisotópicos.

Se describe un método para el tratamiento de cáncer en mamíferos por administración

5 intratumoral, intraperitoneal, intratraqueal, intracraneal o sistémica de composiciones farmacéuticas que comprenden un ácido nucleico, un polímero de administración de ácido nucleico y por lo menos un fármaco quimioterapéutico complementario. Las composiciones de la invención se pueden usar para tratar cáncer mamífero seleccionado de un grupo que consiste en tumores primarios o metastáticos de ovario, mama, cerebro, cabeza y cuello, hígado, pulmón, próstata, riñón, colon, páncreas, tiroides, vejiga urinaria, cavidad abdominal, cavidad torácica y piel. El ácido nucleico y el polímero de administración de genes se pueden administrar por administración intratumoral, intraperitoneal, intratraqueal u oral o sistémica, antes o después de la administración de los agentes farmacéuticos. Por ejemplo, en algunos casos se prefiere administrar el ácido nucleico (p. ej., pIL-12 DNA/polímero) antes del agente farmacéutico (p. ej., quimioterapia), ya que esto potenciaría potencialmente la sensibilidad del tumor al agente farmacéutico y dispararía una respuesta anti-cáncer. En otro caso, se prefiere administrar el agente farmacéutico (p. ej., quimioterapia) antes de la administración del gen (p. ej., pIL-12/PPC) para permitir que el agente farmacéutico cause la destrucción del tumor y la liberación posterior de antígenos del tumor para ser utilizados por el gen terapéutico (p. ej., pIL-12/polímero) a fin de producir una respuesta terapéutica altamente específica y robusta (p. ej., respuesta inmunitaria) contra el cáncer diana.

20 El tratamiento de tumores con dicha composición farmacéutica (ácido nucleico más polímero de administración de genes y uno o más agentes quimioterapéuticos) produce el encogimiento del tumor y la prolongación de la vida. La combinación de genoterapia (ácido nucleico y polímeros de administración de genes) con quimioterapia (agentes quimioterapéuticos) de acuerdo con el método de la presente invención produce eficacia aditiva y/o sinérgica. La eficacia del método de la presente invención se define como, aunque sin limitarse a ello, encogimiento del tamaño del tumor o reducción de la densidad del tumor, un incremento en el recuento de linfocitos o un incremento en el recuento de neutrófilos, o una mejoría en la supervivencia, o todo lo antedicho. A su vez, la combinación de genoterapia (ácido nucleico y polímeros de administración de genes) con quimioterapia (agentes quimioterapéuticos) de acuerdo con el método de la presente invención reduce la toxicidad del agente quimioterapéutico y revierte la resistencia del tumor a la quimioterapia. La toxicidad se define en la presente memoria como cualquier efecto adverso relacionado con el tratamiento en la observación clínica, incluyendo sin limitación, hematología o química en suero anormal, o toxicidad orgánica. Además, la combinación de genoterapia (ácido nucleico y polímeros de administración de genes) con una dosis subóptima de quimioterapia (agentes quimioterapéuticos) de acuerdo con la presente invención potencia el efecto anticáncer hasta un nivel equivalente o superior a aquel logrado con la dosis óptima del agente quimioterapéutico pero con menor toxicidad.

35 En dicha terapia combinada, el ácido nucleico puede ser un miembro seleccionado del grupo que consiste en DNA plasmídico, siRNA, RNA sentido, RNA antisentido y ribozimas. El ácido nucleico puede ser un sistema de expresión de genes basado en plásmidos que contiene una secuencia de DNA que codifica una proteína antineoplásica o antiproliferativa seleccionada del grupo que consiste en interleucina-2, interleucina-4, interleucina-7, interleucina-12, interleucina-15, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$ , factor estimulante de colonias, factor estimulante de granulocitos y macrófagos, agentes antiangiogénicos, genes supresores de tumores, timidina cinasa, eNOS, iNOS, p53, p16, TNF- $\alpha$ , ligando Fas, oncogenes mutados, antígenos tumorales, antígenos víricos o antígenos bacterianos. El DNA plasmídico puede también codificar una molécula de shRNA diseñada para inhibir proteína(s) implicada en el crecimiento o mantenimiento de células tumorales u otras células hiperproliferativas. Un DNA plasmídico puede codificar simultáneamente una proteína terapéutica y una o más moléculas de shRNA. Asimismo, el ácido nucleico de dicha composición puede además ser una mezcla de DNA plasmídico y RNA sintético. El polímero de administración de genes es un polímero catiónico o un polímero no condensante. El polímero catiónico se selecciona del grupo que comprende polilisina, polietilenimina, derivados funcionalizados de polietilenimina, polipropilenimina, aminoglucósido-poliamina, didesoxi-diamino-b-ciclodextrina, espermina y espermidina. Un ejemplo de un polímero de administración de genes adecuado para la presente invención es un lipopolímero que comprende una cadena principal de polietilenimina (PEI), un colesterol y un espaciador de polietilenglicol, donde el colesterol está directamente unido a la cadena principal de polietilenimina o covalentemente unido al espaciador de polietilenglicol, que a su vez está unido, mediante un enlace biocompatible, a la PEI. El polímero de administración de genes de la presente invención puede además comprender un resto diana que incluye anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, receptores celulares, receptores de los factores de crecimiento, receptores del factor de crecimiento epidérmico, receptores de citocinas, folato, transferrina, factor de crecimiento epidérmico (EOF), insulina, asialoorosomucoide, manosa-6-fosfato (monocitos), manosa (macrófago, algunas células B), Lewis<sup>x</sup> y sialilo Lewis<sup>x</sup> (células endoteliales), N-acetil-lactosamina (células T), galactosa (células de carcinoma de colon) y trombomodulina (células endoteliales de pulmón de ratón), agentes fusogénicos tales como polimixina B y hemaglutinina HA2, agentes lisosomotrópicos, señales de localización de núcleo (NLS) tales como antígeno T y similares.

El fármaco quimioterapéutico puede ser un miembro seleccionado del grupo que consiste en texanos, platinos, adriamicinas, ciclofosfamida, topotecán, carmustina (BCNU) o una combinación de éstos. Se prefieren particularmente paclitaxel, carboplatino, topotecán, gemcitabina y cualquiera de sus combinaciones.

5 En otra realización, el agente farmacéutico puede ser un anticuerpo antineoplásico seleccionado del grupo que consiste en anticuerpo CD20, anticuerpo HER2/neu, anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo del receptor del factor de crecimiento epidérmico y sus conjugados radioisotópicos.

10 Se describe en la presente memoria un método para el tratamiento de cáncer o trastornos hiperproliferativos en mamíferos por administración intratumoral, intraperitoneal, intratraqueal, intracraneal o sistémica de composiciones farmacéuticas que comprenden un sistema de expresión de genes basado en plásmido y un polímero de administración de genes, sin un fármaco quimioterapéutico. Las composiciones de la invención se pueden utilizar para tratar cáncer mamífero seleccionado del grupo que consiste en tumores primarios o metastáticos de ovario, mama, cerebro, cabeza y cuello, tiroides, hígado, pulmón, páncreas, intestino, bazo, próstata, riñón, vejiga urinaria, colon y melanoma. Preferiblemente, el ácido nucleico es un sistema de expresión de genes basado en plásmido que contiene una secuencia de DNA que codifica una proteína antineoplásica o antiproliferativa seleccionada del grupo que  
15 consiste en interleucina-2, interleucina-4, interleucina-7interleucina-12interleucina-15, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$ , factor estimulante de colonias, factor estimulante de granulocitos y macrófagos, factor antiangiogénico, genes supresores de tumores, timidina cinasa, eNOS, iNOS, p53, p16, TNF- $\alpha$ , ligando Fas, oncogenes mutados, antígenos tumorales, antígenos víricos o antígenos bacterianos. El DNA plasmídico puede también codificar una molécula de shRNA diseñada para inhibir proteína(s) implicadas en el crecimiento o el mantenimiento de células tumorales u otras células hiperproliferativas. Un DNA plasmídico puede codificar simultáneamente una proteína terapéutica y una o más moléculas shRNA. A su vez, el ácido nucleico de la composición mencionada puede ser también una mezcla de DNA plasmídico y RNA sintético. El tratamiento de tumores con la composición farmacéutica (ácido nucleico más polímero de administración de genes y uno o más agentes terapéuticos) produce el achicamiento del tumor y la prolongación de la vida.

## 25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 ilustra la diferencia en la eficacia de la transferencia de genes entre los polímeros de administración de genes PEG-PEI-Colesterol (PPC) y un lipopolímero soluble en agua, PEI-Col (WSLP). Los polímeros de prueba formaron complejo con un plásmido de luciferasa y se administraron por vía intratumoral a tumores de mama 4T1. La expresión de luciferasa se cuantificó en los tejidos tumorales 24 horas después.

30 La FIG. 2 ilustra el efecto de aumentar la relación PEG:PEI en PEG-PEI-Col sobre la eficiencia de la transferencia de genes a tumores 4T1 sólidos por administración intratumoral de complejos de plásmido/PPC. El polímero PPC, sintetizado en diferentes relaciones PEG:PEI, formó complejo con un plásmido de luciferasa y se administró por vía intratumoral a tumores de mama 4T1. La expresión de luciferasa se cuantificó en los tejidos tumorales 24 horas después.

35 La FIG. 3 ilustra la transferencia del gen de IL-12 a tumores de mama sólidos por administración intratumoral (A) y a tumores ováricos diseminados en la cavidad peritoneal (tumores ID8) por inyección intraperitoneal (B) de complejos de pmIL-12/PPC. PPC formó complejo con un plásmido de expresión del gen IL-12 (pmIL-12), y se administró por vía intratumoral a tumores de mama 4T1 y por vía intraperitoneal a ratones que portaban el tumor peritoneal ID8. Se cuantificaron los niveles de IL-12 después de 24 horas en los tumores 4T1 y después de 1, 2, 3 y 7 días en la ascitis peritoneal en los animales que portaban el tumor ID8.

La FIG.4 ilustra el transcurso de tiempo de la producción de IFN- $\gamma$  que le sigue a la administración intraperitoneal de pmIL-12/PPC. PPC formó complejo con un plásmido de expresión del gen IL-12 de ratón (pmIL-12), y se administró por vía intraperitoneal a ratones que portaban el tumor peritoneal ED8. Se cuantificaron los niveles de IFN- $\gamma$  en ascitis peritoneal después de 1, 2, 3 y 7 días.

45 La FIG. 5 ilustra la inhibición dependiente de la dosis de tumores ováricos diseminados en la cavidad peritoneal por administración intraperitoneal de complejos pmIL-12/PPC. Los complejos pmIL-12/PPC, preparados en distintas dosis de DNA, se administraron por vía intraperitoneal a ratones que portaban el tumor ED8 diseminado en la cavidad peritoneal. Los animales fueron pesados periódicamente para evaluar los efectos del tratamiento sobre la carga del tumor, y se registraron los datos de supervivencia.

50 La FIG. 6 ilustra el avance en la supervivencia de ratones que portan tumores ováricos diseminados en la cavidad peritoneal por administración intraperitoneal de complejos pmIL-12/PPC.

La FIG. 7 ilustra el avance en la supervivencia de los ratones que portaban tumores colorrectales diseminados en la cavidad peritoneal por administración intraperitoneal de los complejos pmIL-12/PPC. Los complejos pmIL-12/PPC se administraron por vía intraperitoneal a ratones que portaban los tumores. Se vigiló la supervivencia de los animales de  
55 ensayo y control.

La FIG. 8 ilustra el avance en la supervivencia de ratones que portaban glioma GL-261. por administración intratumoral de complejos pmlL-12/PPC. Los complejos pmlL-12/PPC se administraron a la cavidad craneal al momento de la implantación del tumor. Se vigiló la supervivencia de los animales de ensayo y control.

5 La FIG. 9 ilustra la inhibición de carcinoma de células escamosas subcutáneo por administración intratumoral de complejos pmlL-12/PPC. Los complejos pmlL-12/PPC se administraron por vía intratumoral a tumores SCCVII subcutáneos 6-7 días después de la implantación del tumor, y el tratamiento se repitió una vez por semana por un total de 4 semanas. Para evaluar la eficacia del tratamiento, se midió periódicamente el tamaño del tumor.

10 La FIG. 10 ilustra la inhibición de los tumores ováricos diseminados en la cavidad peritoneal por terapia combinada que comprendía pmlL-12/PPC intraperitoneal y paclitaxel intravenoso. Los complejos pmlL-12/PPC se administraron por inyección intraperitoneal 21 días después de la implantación de células tumorales. El tratamiento pmlL-12/PPC se repitió 7 días después. El paclitaxel se administró por vía intravenosa solamente una vez, el día antes de la primera inyección del gen. Se vigiló la supervivencia de los animales de ensayo y control.

15 La FIG. 11 ilustra la inhibición de tumores ováricos ID8 diseminados en la cavidad peritoneal por terapia combinada que comprendía pmlL-12/PPC intraperitoneal y quimioterapia de gemcitabina. Los ratones que portaban el tumor se trataron con gemcitabina intraperitoneal 14 días después de la implantación del tumor, y el tratamiento se repitió una vez por semana por un total de 4 tratamientos. El primer tratamiento de pmlL-12/PPC se administró 17 días después de la implantación del tumor por inyección intraperitoneal y se repitió una vez por semana por un total de 4 tratamientos. Se vigiló la supervivencia de los animales de ensayo y control.

20 La FIG. 12 ilustra la inhibición de tumores ováricos diseminados en la cavidad peritoneal por terapia combinada que comprendía pmlL-12/PPC intraperitoneal y quimioterapia de carboplatino/paclitaxel. El tratamiento de quimioterapia comenzó 15 días después de la implantación del tumor, se administró carboplatino una vez por semana durante 4 semanas y Taxol una vez cada dos semanas por un total de dos tratamientos. El primer tratamiento de pmlL-12/PPC se administró 18 días después de la implantación del tumor por inyección intraperitoneal y se repitió una vez por semana por un total de 4 tratamientos. Se vigiló la supervivencia de los animales de ensayo y control.

25 La FIG. 13 ilustra la inhibición de tumores SCCVH por administración intratumoral de complejos pmlL-12/PPC y quimioterapia de ciclofosfamida. Los complejos pmlL-12/PPC se administraron por vía intratumoral a tumores SCCVH subcutáneos 6-7 días después de la implantación del tumor, y el tratamiento se repitió una vez por semana durante un total de 4 semanas. Se administró Cytoxan por vía intravenosa un día antes de la inyección de los genes y se repitió después de 14 días. Para evaluar la eficacia del tratamiento, se midió periódicamente el tamaño del tumor.

30 La FIG. 14 ilustra la inhibición del glioma GL261 por administración intratumoral de complejos pmlL-12/PPC y quimioterapia de BCNU. Los complejos pmlL-12/PPC se administraron a la cavidad craneal al momento de la implantación del tumor. Se administró BCNU como una oblea de Gliadel 5 días después de la implantación del tumor. Se vigiló la supervivencia de los animales de ensayo y control.

35 La FIG. 15 ilustra que la adición de la genoterapia de IL-12/PPC a la quimioterapia de bajas dosis de carboplatino/paclitaxel no incrementa la toxicidad. En comparación, el tratamiento con quimioterapia de altas dosis de carboplatino/paclitaxel condujo a un índice de 30% de muertes asociadas al tratamiento. El tratamiento de quimioterapia comenzó 15 días después de la implantación del tumor, se administró carboplatino una vez por semana durante 4 semanas, y Taxol una vez cada dos semanas por un total de dos tratamientos. El primer tratamiento de pmlL-12/PPC tuvo lugar 18 días después de la implantación del tumor por inyección intraperitoneal y se repitió una vez por semana por un total de 4 tratamientos. Todo el ciclo de tratamiento se repitió tres veces. Se vigiló la supervivencia de los animales de ensayo y control.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 Antes de describir la presente composición y el presente método para administración de un agente bioactivo, se ha de entender que las configuraciones particulares, etapas de procesos y materiales descritos en la presente memoria describen realizaciones particulares solamente y no tienen como fin ser limitativos, ya que el alcance de la presente invención solamente estará limitado por las reivindicaciones anejas.

50 Se ha de observar que, tal como se emplean en esta memoria y en las reivindicaciones anejas, las formas singulares "un," "una" y "el", "la" incluyen las referencias al plural, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por consiguiente, por ejemplo, la referencia a un polímero que contiene "un enlace disulfuro" incluye la referencia a dos o más de dichos enlaces disulfuro, la referencia a "un ligando" incluye la referencia a uno o más de dichos ligandos, y la referencia a "un fármaco" incluye la referencia a dos o más de dichos fármacos.

En la descripción y reivindicación de la presente invención, se empleará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones expuestas a continuación.

55 "Transfectar" o "transfección" significa transportar ácidos nucleicos desde el entorno externo a una célula hasta el entorno celular interno, con referencia particular al citoplasma y/o al núcleo celular. Sin desear influencias de ninguna

5 teoría particular, se ha de entender que los ácidos nucleicos pueden ser suministrados a las células o bien después de ser encapsulados dentro o adheridos a uno o más complejos de polímero catiónico/ácido nucleico o atrapados allí. Los ejemplos particulares de transfección suministran un ácido nucleico a un núcleo celular. Los ácidos nucleicos incluyen DNA y RNA como también sus congéneres sintéticos. Dichos ácidos nucleicos incluyen de sentido alterado, antisentido, finalizador, como también nucleótidos que producen proteínas, nucleótidos reguladores de iniciación y detención, y de velocidad, que controlan la producción de proteínas, péptidos y ácidos nucleicos. En particular, aunque sin limitarse a ello, pueden ser DNA genómico, cDNA, mRNA, tRNA, rRNA, secuencias de híbridos o secuencias sintéticas o semisintéticas, y de origen natural o artificial. Además, el ácido nucleico puede ser de tamaño variable, oscilando entre oligonucleótidos y cromosomas. Estos ácidos nucleicos pueden ser de origen humano, animal, vegetal, bacteriano, vírico o sintético. Pueden obtenerse por cualquier técnica conocida por el experto en la materia.

15 Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "agente farmacéutico" o "fármaco" o cualquier otro término o expresión similar significa cualquier material o compuesto químico o biológico adecuado para administración por los métodos previamente conocidos en la técnica y/o por los métodos descritos en la presente invención, que inducen un efecto biológico o farmacológico deseado, que puede incluir, aunque sin limitarse a ello (1) un efecto profiláctico sobre el organismo, y la prevención de un efecto biológico no deseado tal como la prevención de una infección, (2) alivio de una afección causada por una enfermedad, por ejemplo, alivio de dolor o inflamación causados como consecuencia de una enfermedad, y/o (3) o bien alivio, reducción o eliminación completa de una enfermedad del organismo. El efecto puede ser local, tal como proporcionando un efecto anestésico local, o puede ser sistémico.

20 La presente invención no se refiere a nuevos fármacos o a nuevas clases de agentes bioactivos *per se*. En cambio, se refiere a composiciones de copolímeros catiónicos biocompatibles y métodos para usar dichas composiciones para la administración de genes u otros agentes bioactivos que existen en el estado de la técnica o que pueden consolidarse luego como agentes activos y que son adecuados para administración por la presente invención. Dichas sustancias incluyen clases amplias de compuestos normalmente administrados al organismo. En general, esto incluye, aunque sin limitarse a ello, ácidos nucleicos, tales como DNA, RNA y oligonucleótidos, anti-infectivos tales como antibióticos y agentes antivíricos; analgésicos y combinaciones analgésicas; anoréxicos; antihelmínticos; antiartríticos; antihistamínicos; anticonvulsivos; antidepressivos; antidiabéticos; antidiarreicos; antihistamínicos; antiinflamatorios; preparaciones antimigraña; antivomitivos; antineoplásicos; fármacos antiparkinsonianos; antipruríticos; antipsicóticos; antipiréticos; antiespasmódicos; anticolinérgicos, simpatomiméticos; derivados de xantina; preparaciones cardiovasculares incluyendo bloqueantes del canal de potasio, calcio, beta-bloqueantes, alfa-bloqueantes y antiarrítmicos; antihipertensivos; diuréticos y antiuréticos; vasodilatadores incluyendo estimulantes coronarios, periféricos y cerebrales; del sistema nervioso central; vasoconstrictores; preparaciones para la tos y el resfriado, incluyendo descongestivos; hormonas tales como estradiol y otros esteroides incluyendo corticosteroides; hipnóticos; inmunosupresores; relajantes musculares, parasimpaticolíticos; psico-estimulantes; sedantes y tranquilizantes. Por el método de la presente invención, se pueden administrar los fármacos en todas las formas, p. ej., ionizados, no ionizados, de base libre, sales de adición de ácidos y similares, como también los fármacos de bajo o alto peso molecular. La única limitación al género o especie de agente bioactivo que se ha de administrar es aquella de la funcionalidad que puede determinarse fácilmente por experimentación de rutina.

40 Tal como se emplea en la presente memoria, el término "biocompatible" o "biodegradación" se define como la conversión de materiales en intermedios menos complejos o productos terminados por hidrólisis de solubilización, o por la acción de entidades biológicamente formadas que pueden ser enzimas y otros productos del organismo.

Tal como se emplea en la presente memoria, "cantidad eficaz" significa la cantidad de ácido nucleico o de un agente bioactivo que es suficiente para proveer el efecto local o sistémico deseado y el desempeño deseado con una relación razonable de riesgo/beneficio, que se esperaría de cualquier tratamiento médico.

45 Tal como se emplea en la presente memoria, "péptido" significa péptidos de cualquier longitud, e incluye proteínas. Los términos "polipéptido" y "oligopéptido" se emplean en la presente memoria sin ninguna limitación particular de tamaño, a menos que se establezca específicamente un tamaño particular. Los ejemplos típicos de péptidos que se pueden utilizar se seleccionan del grupo que consiste en oxitocina, vasopresina, hormona adrenocorticotrópica, factor de crecimiento epidérmico, prolactina, luliberina u hormona liberadora de la hormona luteinizante, hormona del crecimiento, factor liberador de la hormona del crecimiento, insulina, somatostatina, glucagón, interferón, gastrina, tetragastrina, pentagastrina, urogastroína, secretina, calcitonina, encefalinas, endorfinas, angiotensinas, renina, bradiquinina, bacitracinas, polimixinas, colistinas, tirocidina, gramicidinas y análogos sintéticos, sus modificaciones y fragmentos farmacológicamente activos, anticuerpos monoclonales y vacunas solubles. La única limitación al fármaco de proteína o péptido que se puede utilizar es una de funcionalidad.

55 Tal como se emplea en la presente memoria, un "derivado" de carbohidrato incluye, por ejemplo, una forma de ácido de un azúcar, p. ej., ácido glucurónico; una amina de un azúcar, p. ej., galactosamina; un fosfato de un azúcar, p. ej., manosa-6-fosfato y similares.

Tal como se emplea en la presente memoria, "administrar" y términos similares significa proporcionar la composición al individuo que se está tratando, de manera tal que la composición sea capaz de circular en forma sistémica, donde

la composición se une a una célula diana y es absorbida por endocitosis. Por lo tanto, la composición se administra preferiblemente al individuo, típicamente por las rutas subcutánea, intramuscular, transdérmica, intravenosa o intraperitoneal. Los inyectables para tal uso pueden prepararse en formas convencionales, o bien como una disolución o suspensión líquida, o en una forma sólida que sea adecuada para preparación como disolución o suspensión en un líquido antes de la inyección, o como una emulsión. Los excipientes adecuados que se pueden utilizar para administración incluyen, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa, glicerol, etanol y similares, y si se desea, cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, y similares.

Tal como se emplea en la presente memoria, "eficacia" y términos similares significan la desaparición del tumor o el encogimiento del tumor en tamaño, o reducción de la densidad del tumor, o aumento en el recuento de linfocitos o aumento en el recuento de neutrófilos o avance en la supervivencia, o todo lo antedicho.

Tal como se emplea en la presente memoria, "toxicidad" se define como cualquier efecto adverso asociado al tratamiento en la observación clínica, incluyendo sin limitación, hematología o resultados de química en suero anormales, o toxicidad orgánica.

Las nuevas estrategias de tratamiento del cáncer se centran en la administración de macromoléculas que portan información genética, en lugar de una proteína terapéutica propiamente dicha, permitiendo que los genes administrados en forma exógena se expresen en el entorno tumoral. Los métodos que utilizan sistemas de administración de genes no víricos se consideran seguros comparados con los sistemas de administración víricos, pero la aplicación práctica de los sistemas poliméricos actuales no ha sido satisfactoria debido a la deficiente eficiencia. Se ha descrito recientemente una estrategia mediante la cual la eficiencia de la transfección génica de un PEI de bajo peso molecular se potenció por unión covalente de colesterol formando un lipopolímero soluble en agua (WSLP). Véase, *Mol. Ther.*, 2001, 4, 130. La transferencia del gen de IL-12 a tumores sólidos con WSLP fue significativamente mejor que con el PEI no modificado y condujo a una inhibición del tumor más significativa.

La presente invención provee un nuevo sistema polimérico, PEG-PEI-Colesterol (PPC), que difiere de WSLP (PEI-Colesterol) en el sentido que contiene restos PEG y produce una eficiencia de transfección significativamente superior en los tumores (FIG. 1). La adición de PEG está diseñada para potenciar la estabilidad de los complejos de ácido nucleico/polímero en el medio biológico a fin de manejar esta deficiencia de la técnica anterior (WSLP). Asimismo, la adición de cadenas de PEG permite la incorporación de ligandos en la cadena de PPC para mejorar la selectividad de tejido de la administración. Por ejemplo, el resto de colesterol que está directamente unido a la cadena principal PEI en la técnica anterior (WSLP) puede extenderse más a partir de la cadena principal PEI para crear una geometría más flexible para la interacción del receptor celular. El control del número de moléculas PEG por unidad de la cadena principal PEI es importante para lograr la potenciación óptima en la actividad de transfección. Como se ilustra en la FIG. 2, la magnitud de la transferencia génica al tumor depende de la relación entre los diferentes componentes de PPC, el PEG, PEI y colesterol. Un intervalo preferido de la composición fue una relación molar PEG:PEI de 2-4 a un contenido de colesterol fijo. La relación óptima entre PEI y colesterol fue 1:0.5 a 1:1. La capacidad de PPC de promover la transferencia génica a tumores se examinó con un gen terapéutico. El plásmido de expresión que contenía los genes IL-12 (pmlL-12) de ratón formó complejo con PPC en una relación de nitrógeno (N) a fosfato (P) (relación N:P) de 11:1 y se administró por vía intratumoral a ratones con tumores 4T1 sólidos, o por vía intraperitoneal a ratones con tumores ováricos diseminados a la cavidad peritoneal.

En ambos modelos de tumores, la transferencia del gen IL-12 se manifestó por un incremento en los niveles de IL-12 (FIG. 3). En los ratones que portaban el tumor peritoneal, se alcanzaron los niveles de IL-12 post-tratamiento al cabo de 24 horas y declinaron hasta el nivel inicial aproximadamente a los 7 días. La cinética de la acción de IL-12 se relacionó estrictamente con una elevación de IFN- $\gamma$ , un mediador en dirección 3' de las acciones de IL-12 (FIG. 4). La elevación en los niveles de IFN- $\gamma$  estuvo algo demorada tal como se esperaba, y permaneció elevada encima del valor inicial después de 7 días. Estos datos demuestran que las composiciones que comprenden plásmidos de expresión de IL-12 y PPC son capaces de manifestar la transferencia del gen de IL-12 en diferentes tipos de tumores y por diferentes rutas de administración. La transferencia del gen de IL-12 mediada por pmlL-12/PPC es terapéuticamente significativa, ya que conduce a una inhibición significativa del crecimiento del tumor.

En ratones con tumores de ovario diseminados a la cavidad peritoneal, la administración intraperitoneal de complejos pmlL-12/PPC (relación N:P 11:1) en una dosis de DNA de 10-250  $\mu$ g redujo significativamente la carga del tumor (FIG. 5) y mejoró la supervivencia (FIG. 6) en un modo dependiente de la dosis. El efecto terapéutico de pmlL-12/PPC (relación N:P 11:1) también se observó en cáncer colorrectal. La administración intraperitoneal de 25  $\mu$ g de complejos pmlL-12/PPC en ratones con cáncer colorrectal diseminado a la cavidad peritoneal prolongó significativamente su supervivencia, en comparación con animales no tratados (FIG. 7). La eficacia anticáncer de la transferencia del gen de IL-12 por pmlL-12/PPC también se observó en tumores sólidos después de la administración intratumoral. La FIG. 8 ilustra los efectos de la inyección intratumoral de pmlL-12/PPC sobre el desarrollo de tumores cerebrales GL261. El tratamiento de implantes intracraneales de glioma GL261 de ratón por administración local de complejos pmlL-12/PPC (relación N:P 11:1) mejoró significativamente la supervivencia. En ratones con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello implantado subcutáneamente, la administración intratumoral de complejos pmlL-12/PPC una vez por semana durante cuatro semanas produjo una inhibición significativa del índice de crecimiento del tumor (Fig. 9). El efecto antineoplásico de los complejos pmlL-12/PPC también se observó en tumores ováricos y mamaros.

La composición utilizada en la presente invención (ácido nucleico y polímero de administración de genes) no ejerce efectos colaterales adversos cuando se administra *in vivo*. Por ejemplo, ninguna muerte o signos clínicos de toxicidad relacionados con el compuesto se asociaron con la administración de pmlL-12/PPC; pmlL-12/PPC intraperitoneal o subcutáneo fue bien tolerado tanto en ratones macho como hembra en dosis de 10, 50 y 250 ug por animal. El examen histopatológico de los animales en ambos grupos de dosis IP y SC no demostró signos de toxicidad sistémica debida a pmlL-12/PPC, se observó inflamación leve en los órganos ubicados en o adyacentes al sitio de inyección, pero ésta cedió durante un periodo de recuperación de un mes. Estos resultados demuestran que las composiciones de ácido nucleico/polímero para el tratamiento del cáncer son eficaces contra una diversidad de tipos de cáncer cuando se administran por diferentes modos de administración, y que la administración repetida *in vivo* no causa toxicidad grave.

Se reconoce ampliamente que una estrategia de tratamiento individual contra el cáncer en general es ineficaz debido a la naturaleza multifactorial de esta enfermedad. El beneficio de la combinación de más de un fármaco para maximizar la respuesta anticáncer es cada vez más reconocido. A pesar de los datos preclínicos alentadores, el éxito clínico de las combinaciones quimio-quimio o de las combinaciones quimio-citocina examinado hasta la fecha no ha sido satisfactorio debido a la toxicidad inherente de los fármacos quimioterapéuticos y de las proteínas citocinas recombinantes. Esto garantiza la necesidad de un planteamiento de quimioinmunoterapia más seguro para reducir la toxicidad de las proteínas y mejorar la eficacia. En la presente descripción, se ha combinado un agente quimioterapéutico con administración de un gen antineoplásico administrado localmente al sitio del tumor para mejorar la seguridad y eficacia del tratamiento. Al combinar la administración local segura y eficiente de un gen antineoplásico con un agente quimioterapéutico estándar se potenciará la respuesta anticáncer y la supervivencia del paciente sin aumentar la toxicidad. Esta terapia combinada reducirá la dosis de quimioterapia y aumentará la sensibilidad del tumor a la quimioterapia. Está demostrado que las composiciones farmacéuticas que comprenden un gen antineoplásico que forma complejo con un polímero de administración de genes catiónico, y por lo menos un fármaco quimioterapéutico complementario, es más eficaz que la genoterapia o la quimioterapia administradas solas. Además, la terapia combinada es eficaz contra una gran variedad de tumores cuando se administra por diferentes rutas de administración, y no aumenta la toxicidad comparada con las terapias individuales.

La respuesta anticáncer a la terapia combinada está demostrada en tumores ováricos implantados en la cavidad peritoneal. La administración intravenosa de paclitaxel (Taxor®) (8 mg/kg) o la administración intraperitoneal de plásmido mL-12 (25 - 100 ug)/complejos PPC (relación N:P 11:1) produjo reducción del tumor y mejora de la supervivencia en los ratones que portaban los tumores. El tratamiento de pmlL-12/PPC fue más eficaz que el tratamiento de paclitaxel. La combinación del gen de IL-12 y terapia de paclitaxel produjo mayor respuesta del tratamiento que los tratamientos individuales (FIG. 10). Se observó un efecto similar de la terapia combinada en cáncer de ovario cuando se combinó genoterapia de IL-12 con otro agente quimioterapéutico, gemcitabina (Gemzar®) (FIG.II). La actividad antineoplásica de la gemcitabina se potenció significativamente cuando se usó junto con el tratamiento de pmlL-12/PPC. Se investigó la combinación de genoterapia de IL-12 con una mezcla de dos agentes quimioterapéuticos. Como se indica en la FIG. 12, la combinación de genoterapia de IL-12 con un cóctel de carboplatino (Paraplatin®)/paclitaxel produjo una mayor supervivencia que la terapia de IL-12 o la quimioterapia solas. La adición de genoterapia de IL-12 a una dosis subóptima de carboplatino/paclitaxel potenció la eficacia terapéutica similar a aquella lograda con una alta dosis de quimioterapia (FIG. 12) sin aumentar la toxicidad.

El avance en la respuesta anticáncer por la terapia combinada se observó también en tumores sólidos. Por ejemplo, en carcinoma de células escamosas subcutáneo de la cabeza y el cuello, la administración intravenosa del agente quimioterapéutico ciclofosfamida (150 mg/kg) redujo significativamente el crecimiento del tumor, pero no lo inhibió por completo (FIG. 13). La inyección intratumoral de pmlL-12/PPC solo causó aproximadamente 30% de inhibición del crecimiento del tumor. En contraste con los tratamientos individuales, el tratamiento combinado de ciclofosfamida más pmlL-12/PPC causó una inhibición completa del crecimiento del tumor. El rechazo total aumentó drásticamente de solamente 10% con ciclofosfamida a 55% con ciclofosfamida más los complejos pmlL-12/PPC. Una sola inyección intratumoral de una dosis subóptima (1,5 ug) de complejos pmlL-12/PPC en tumores cerebrales GL261 no potenció de manera significativa el índice de supervivencia de los animales. No obstante, la combinación de esta dosis subóptima de pmlL-12/PPC con el agente quimioterapéutico BCNU (oblea Gliadel®) produjo una mejoría significativa del índice de supervivencia (FIG. 14).

El tratamiento del cáncer con quimioterapia de altas dosis se asocia con toxicidad grave. Para examinar si la adición de IL-12/PPC a quimioterapia de baja dosis aumenta la toxicidad relacionada con el tratamiento, se trataron ratones que portaban tumores ováricos diseminados en la cavidad peritoneal con tres ciclos de tratamiento (en comparación con un solo ciclo de tratamiento) de IL-12/PPC y quimioterapia de baja dosis, y se vigilaron los signos de toxicidad. Se realizó una comparación directa con los animales tratados con tres ciclos de tratamiento de quimioterapia de alta dosis. Como se muestra en la FIG. 15, 50% del grupo de quimioterapia de alta dosis murió debido a toxicidad relacionada con el tratamiento (es decir, antes de alcanzar los 40 gramos), mientras que ninguno del grupo de IL-12/PPC + quimioterapia de baja dosis murió por toxicidad del tratamiento. Estos resultados demuestran que la toxicidad de la quimioterapia convencional (alta dosis) para el cáncer puede reducirse significativamente disminuyendo la dosis de la quimioterapia y añadiendo genoterapia de IL-12 más segura y eficaz.

Estos datos demuestran la eficacia antineoplásica de dichas composiciones que comprenden plásmidos de IL-12 y un nuevo polímero de administración de genes, y su aumento con un solo agente o una mezcla de agentes quimioterapéuticos. El planteamiento de combinación provee un método mediante el cual la eficacia de una dosis subóptima de un régimen de quimioterapia se potencia sin aumentar la toxicidad.

- 5 Los siguientes ejemplos permitirán al experto en la técnica entender más claramente cómo practicar la presente invención. Se ha de entender que, si bien la invención se ha descrito junto con sus realizaciones específicas preferidas, lo siguiente tiene como fin ilustrar y no limitar el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

- 10 Transferencia del gen IL-12 a tumores diseminados a la cavidad peritoneal o subcutáneos por administración local de complejos pIL-12/PPC

Se examinó la capacidad de la administración local de complejos pIL-12/PPC para producir niveles de IL-12 en ratones que portaban tumores subcutáneos y diseminados en la cavidad peritoneal. Para estudios de tumores subcutáneos, se inyectaron subcutáneamente (sc) a los flancos derechos e izquierdos de ratones BALB/c (7 semanas, 14-18 gramos)  $1 \times 10^6$  células 4T1. Después de que los tumores habían alcanzado un tamaño de aproximadamente  $60 \text{ mm}^3$ , se les inyectaron complejos pIL-12/PPC que contenían 6 ug de DNA. Los ratones fueron sacrificados 24 horas después, y se extirparon los tumores para análisis de mL12 por ELISA. Los niveles de mL-12 en los tumores 24 horas después de la inyección se muestran en la Fig. 3A.

20 Para los estudios de tumores peritoneales, ratones C57/BL6 hembra recibieron inyecciones intraperitoneales (ip) de  $5 \times 10^6$  células ID8 en un volumen de 500  $\mu\text{l}$ . Los tratamientos comenzaron cuando la carga del tumor (peso del ratón) alcanzó aproximadamente 20 gramos (~21 días después de la inyección de las células). Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de una sola dosis de pIL-12/PPC en una relación 11:1 nitrógeno (N) a fosfato (P) (relación N:P) en un volumen de 500  $\mu\text{l}$ . Se extrajo fluido de ascitis de los animales que portaban el tumor 1, 2, 3 y 7 días después de que los ratones habían sido tratados con pIL-12/PPC. Se determinaron los niveles de mL-12 e IFN- $\gamma$  por ELISA y se normalizaron hasta líquido ascítico total. Los resultados indican que se observan niveles significativos de mL-12 en líquido ascítico con niveles máximos logrados 1 día después del tratamiento, con niveles que caen hasta cerca de la línea inicial alrededor de 7 días después del tratamiento (FIG. 3B). Se observa un aumento similar de los niveles de IFN- $\gamma$ , pero los niveles máximos se demoran temporalmente (pico en el día 3) con respecto a los niveles de IL-12 y alrededor de 7 días después del tratamiento habían caído pero estaban todavía significativamente por encima de los niveles iniciales (FIG. 4).

- 30 EJEMPLO 2

Tratamiento de tumores ováricos diseminados en la cavidad peritoneal por administración intraperitoneal de complejos pIL-12/PPC

35 Los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de  $5 \times 10^6$  células ID8 a un volumen de 500  $\mu\text{l}$ . Los tratamientos comenzaron cuando la carga del tumor (peso del ratón) alcanzó aproximadamente 20 gramos (~21 días después de la inyección de las células). Los ratones recibieron tres inyecciones semanales intraperitoneales de 10-250  $\mu\text{g}$  de pIL-12 formando complejo con PPC en una relación N:P de 11:1 en un volumen de 500  $\mu\text{l}$ . Los ratones fueron pesados periódicamente durante el curso del estudio. El aumento de peso es causado predominantemente por la acumulación de ascitis, lo cual provee una evaluación indirecta del avance de la enfermedad y de la carga del tumor. El tratamiento de pIL-12/PPC produjo una inhibición de la carga del tumor dependiente de la dosis (FIG. 5) y la prolongación de la supervivencia del animal (FIG., 6).

- 40 EJEMPLO 3

Tratamiento de tumores colorrectales diseminados en la cavidad peritoneal por administración intraperitoneal de complejos pIL-12/PPC

45 Los ratones recibieron inyecciones de  $0,1 \times 10^6$  células CT26 en un volumen de 500  $\mu\text{l}$ . Los tratamientos comenzaron 1 día después de la implantación del tumor. Los ratones recibieron cinco inyecciones semanales intraperitoneales de 50  $\mu\text{g}$  de pIL-12 en formando complejo con PPC, o 25  $\mu\text{g}$  de pIL-12 formando complejo con LPPC6 en una relación N:P de 11:1 en un volumen de 500  $\mu\text{l}$ . LPPC6 es una polietilimina lineal de 15 kD a la que se unen independientemente una molécula de mPEG y 6 moléculas de colesterol. Como se ilustra en la Fig. 7, el tratamiento de pIL-12/PPC y pIL-12/LPPC6 produjo una mejoría significativa en la supervivencia en comparación con los controles no tratados en este modelo de tumor altamente agresivo.

- 50 EJEMPLO 4

Tratamiento de cáncer cerebral por administración intratumoral de complejos pIL-12/PPC.

El efecto de la administración local de complejos pmIL-12/PPC se examinó en un modelo de glioma de ratón. Los tumores se implantaron en la corteza cerebral de ratones por inyección intracraneal de  $1 \times 10^5$  células de glioma GL261 junto con la co-inyección de complejos pmIL-12/PPC. Se vigilaron signos de neurotoxicidad en los animales, y se les practicaron autopsias, cuando fue posible, para confirmar que la muerte se debió al tumor intracraneal. La supervivencia se registró usando una curva de análisis de supervivencia Kaplan-Meier. Una inyección intracraneal individual de complejos pmIL-12/PPC administrada en un intervalo de dosis de 2,5 - 30  $\mu\text{g}$  de plásmido fue bien tolerada, ya que no se observaron efectos adversos importantes. Una inyección individual de complejos pmIL-12/PPC en una dosis de 15  $\mu\text{g}$  de plásmido produjo un avance significativo en la supervivencia de los animales (Fig. 8).

## EJEMPLO 5

## 10 Tratamiento de cáncer de cabeza y cuello por administración intratumoral de complejos pIL-12/PPC

Se examinó el efecto de la administración local de complejos pIL-12/PPC sobre el crecimiento de carcinoma de células escamosas implantado subcutáneamente (SCCVH). Se implantaron sc  $4 \times 10^5$  células de carcinoma escamosas en 100  $\mu\text{l}$  en el flanco derecho de ratones CH3 hembra (6-9 semanas, 17-22 gramos) El plásmido mL-12 formó complejo con PPC en una relación N:P de 11:1 y se administró localmente a los tumores en una dosis de DNA de 25  $\mu\text{g}$  en un volumen de inyección de 50  $\mu\text{l}$  una vez por semana durante cuatro semanas, comenzando ~11 días después de la implantación del tumor. Se utilizaron grupos de tratamiento de 12 ratones y se vigiló el crecimiento del tumor dos veces por semana, usando una medición con calibre. Como se indica en la FIG. 9, la administración intratumoral de complejos pmIL-12/PPC produjo una inhibición parcial pero significativa del crecimiento del tumor.

## EJEMPLO 6

## 20 Terapia combinada de pIL-12/PPC más paclitaxel para el tratamiento de tumores ováricos diseminados en la cavidad peritoneal

Se combinó genoterapia de IL-12 intraperitoneal con quimioterapia de paclitaxel para potenciar la respuesta terapéutica a tumores ováricos diseminados en ratones. Los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de  $5 \times 10^6$  células ED8 en un volumen de 500  $\mu\text{l}$ . Los tratamientos comenzaron cuando la carga del tumor (peso del ratón) alcanzó aproximadamente 20 gramos (~21 días después de la inyección de las células). Los ratones recibieron inyección intraperitoneal de 25  $\mu\text{g}$  de pmIL-12 formando complejo con PPC en una relación N:P de 11:1 en un volumen de 500  $\mu\text{l}$ . El tratamiento con el gen se repitió después de 7 días, constituyendo un total de dos inyecciones (Día 1, 8) conforme al estudio. Se administró paclitaxel (Taxol®) solamente una vez (Día 0) por inyección intravenosa en una dosis de 8 mg/kg en un volumen de inyección de 250  $\mu\text{L}$ . Para la terapia de combinación, ambos tratamientos de genoterapia y quimioterapia se administraron como se describió precedentemente. Los animales fueron pesados periódicamente para evaluar el efecto del tratamiento con el gen sobre la carga del tumor. La inyección intraperitoneal de complejos pmIL-12/PPC solos produjo una reducción significativa de la carga del tumor peritoneal. La inhibición de la carga del tumor por los complejos pmIL-12/PPC fue ligeramente superior que con paclitaxel. La adición de genoterapia de IL-12 al paclitaxel produjo una mejoría en la acción del paclitaxel sobre la carga del tumor y la supervivencia (FIG. 10).

## EJEMPLO 7

Terapia combinada de pIL-12/PPC más gemcitabina para el tratamiento de cáncer de ovario diseminado en la cavidad peritoneal

Se evaluó la eficacia de combinar la genoterapia de IL-12 con Gemcitabina (Gemzar®). La gemcitabina pertenece a un grupo general de fármacos de quimioterapia conocidos como antimetabolitos. Se utiliza para tratar cáncer de páncreas, cáncer de mama (junto con paclitaxel) y cáncer de pulmón (junto con cisplatino), y actualmente está siendo evaluado clínicamente para uso contra cáncer de ovario. Para este estudio, los ratones (C57BL/6) recibieron una inyección intraperitoneal de  $2,5 \times 10^6$  células ED8 en un volumen de 500  $\mu\text{l}$  para inducir la formación de tumores diseminados. A los 14 días de la implantación del tumor, se administró gemcitabina por vía intraperitoneal en una dosis de 150 mg/kg en un volumen de 250  $\mu\text{l}$ . El tratamiento se repitió semanalmente por un total de 4 tratamientos. Comenzando 17 días después de la implantación del tumor, los grupos seleccionados de ratones se trataron por vía intraperitoneal con 25  $\mu\text{g}$  de plásmidos de IL-12 formando complejo con PPC en una relación N:P 11:1 en un volumen de 500  $\mu\text{l}$ . La administración del plásmido se repitió semanalmente por un total de cuatro tratamientos. El tratamiento combinado de genoterapia IL-12 y quimioterapia de gemcitabina mejoró significativamente la supervivencia en comparación con cualquiera de las monoterapias solas (FIG. 11).

## EJEMPLO 8

Terapia combinada de PIL-12/PPC más carboplatino/paclitaxel para el tratamiento de cáncer de ovario diseminado en la cavidad peritoneal

La quimioterapia de primera línea para cáncer de ovario sigue siendo un agente de platino (carboplatino, cisplatino) y paclitaxel. Por lo tanto, nos interesaba evaluar el uso de genoterapia de IL-12 en combinación con un régimen de

quimioterapia de carboplatino/paclitaxel. Los ratones (C57BL/6) recibieron inyecciones intraperitoneales de  $2,5 \times 10^6$  células ID8 en un volumen de 500  $\mu$ l. El tratamiento de quimioterapia comenzó 15 días después de la implantación del tumor. La administración de carboplatino (Paraplatin®) fue o bien de 40 mg/kg ip en 250 ml (dosis alta) o de 15 mg/kg en 250  $\mu$ l (dosis baja), y la administración de paclitaxel (Taxol®) fue o bien de 8 mg/kg ip en 250 mg/kg (dosis alta) o 3 mg/kg intraperitoneal en 250 ml (dosis baja). El carboplatino se administró una vez por semana por un total de 4 tratamientos, y el paclitaxel se administró q2w por un total de dos tratamientos. Cuando el carboplatino y el paclitaxel se administraron el mismo día, el paclitaxel se administró primero y luego el carboplatino dos horas más tarde. Comenzando 18 días después de la implantación del tumor, los ratones en los grupos seleccionados se trataron por vía intraperitoneal con 25  $\mu$ g de plásmido IL-12 formando complejo con PPC en una relación N:P de 11:1 en un volumen de 500  $\mu$ l. La administración del plásmido se repitió semanalmente por un total de cuatro tratamientos. Después del final del régimen de tratamiento, se vigiló la supervivencia de los animales. Los resultados indican que tanto la genoterapia de IL-12 como la quimioterapia de carboplatino/paclitaxel de baja dosis produjeron resultados de supervivencia similares (FIG. 12). En contraste, cuando se combinó quimioterapia de baja dosis con genoterapia de IL-12, la eficacia mejoró hasta un nivel casi idéntico a aquel del régimen de tratamiento de quimioterapia de alta dosis. Sería ventajoso poder usar la genoterapia de IL-12 en combinación con quimioterapia de baja dosis con el fin de mantener la eficacia terapéutica y a la vez usar dosis de quimioterapia inferiores con el fin de minimizar las toxicidades. Esto probablemente permitiría que los pacientes permanezcan en los regímenes de tratamiento de quimioterapia por periodos de tiempo prolongados, ofreciendo la posibilidad de una repuesta terapéutica potenciada en gran medida.

#### 20 EJEMPLO 9

Terapia combinada de pIL-12/PPC más ciclofosfamida para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello

Se combinó genoterapia de IL-12 intratumoral con quimioterapia de ciclofosfamida (Cytosan®) para potenciar la respuesta terapéutica en cáncer de cabeza y cuello. Se implantaron  $4 \times 10^5$  células de carcinoma escamosas (SCCVII) en 100  $\mu$ l en el flanco derecho de ratones CH3 hembra (6-9 semanas, 17-22 gramos). Cinco días antes del tratamiento con ciclofosfamida (aproximadamente 11 días después de la implantación del tumor), los plásmidos de mL-12 formaron complejo con PPC en una relación N:P de 11:1 y se administraron localmente a los tumores en una dosis de DNA de 25  $\mu$ g en un volumen de inyección de 50  $\mu$ l una vez por semana durante cuatro semanas. Se administró terapia de ciclofosfamida por vía intravenosa en una dosis de 200 mg/kg en un volumen de inyección de 125  $\mu$ l solo o en combinación con genoterapia de pIL-12. El tratamiento de ciclofosfamida se repitió después de 14 días, constituyendo un total de dos inyecciones por estudio. Para la terapia combinada, tanto la genoterapia como la quimioterapia se administraron como se describió previamente. Se emplearon grupos de tratamiento de 12 ratones, y se vigiló el crecimiento del tumor dos veces por semana, usando medición con calibre. Como se muestra en la FIG. 13, la administración intratumoral de complejos pmlL-12/PPC, o la inyección intravenosa de ciclofosfamida sola produjeron una inhibición parcial del crecimiento del tumor, mientras que su combinación produjo la inhibición completa. Hubo un porcentaje mayor de animales tratados con la terapia de combinación que rechazaron completamente el tumor (55%) en oposición a los animales tratados con quimioterapia sola (10%).

#### 35 EJEMPLO 10

Tratamiento de cáncer cerebral por terapia combinada de pIL-12/PPC intratumoral y BCNU.

Se examinó el efecto de la administración local de complejos pmlL-12/PPC solos o combinados con BCNU (Gliadel®) en un modelo de glioma de ratón. La oblea Gliadel® es una formulación polimérica de carmustina o BCNU, un agente quimioterapéutico de la familia de nitrosourea. Los tumores se implantaron en la corteza cerebral de los ratones por inyección intracraneal de  $1 \times 10^5$  células de glioma GL261 junto con la co-inyección de complejos pmlL-12/PPC. Cinco días después de la implantación del tumor, se implantó Gliadel® que contenía 10% BCNU debajo de la tabla inferior del hueso parietal. Se vigiló a los animales para detectar cualquier signo de neurotoxicidad, y se realizaron las autopsias, cuando fue posible, para confirmar que la muerte fue consecuencia del tumor intracraneal. Se registró la supervivencia usando una curva de análisis de supervivencia Kaplan-Meier. Una sola inyección intracraneal de complejos pmlL-12/PPC administrada en un intervalo de dosis de 2,5 - 30  $\mu$ g de plásmido fue bien tolerada, ya que no se observaron efectos adversos importantes. Una sola inyección de complejos pmlL-12/PPC administrados en una dosis de plásmido de 1,5  $\mu$ g no aumentó el índice de supervivencia. No obstante, la combinación de esta dosis subóptima de pmlL-12/PPC con BCNU potenció en forma significativa la supervivencia (FIG. 14). El avance en la supervivencia a partir de la terapia combinada fue mayor que aquel obtenido históricamente con BCNU solo en este modelo (no se muestran los datos).

#### 50 EJEMPLO 11

55 Comparación de toxicidad de terapia combinada de IL-12/PPC más carboplatino/paclitaxel de baja dosis y terapia combinada de carboplatino/paclitaxel de alta dosis

Los solicitantes han demostrado previamente que combinar IL-12/PPC con carboplatino en bajas dosis (15 mg/kg) y terapia de paclitaxel (3 mg/kg) produce una eficacia anticáncer similar a la quimioterapia de carboplatino (40 mg/kg) y

5 paclitaxel (8 mg/kg) en altas dosis (Ejemplo 8, Fig. 12). En este ejemplo, se examina si IL-12/PPC más la  
quimioterapia combinada en baja dosis es menos tóxica que la quimioterapia en alta dosis. Los ratones que portaban  
tumores ováricos diseminados en la cavidad peritoneal recibieron tres ciclos de tratamiento de IL-12/PPC +  
10 quimioterapia de baja dosis o quimioterapia de alta dosis en comparación solamente con un ciclo de tratamiento  
utilizado en los ejemplos previos. La mortalidad animal que ocurría antes de alcanzar el valor de corte de peso de 40  
gramos (criterio para sacrificar a los animales debido al avance de la enfermedad) y que no demostraba carga del  
15 tumor significativa en la autopsia se consideró relacionada con el tratamiento. Los ratones (C57BL/6) recibieron  
inyecciones intraperitoneales de  $2,5 \times 10^6$  células ID8 en un volumen de 500  $\mu$ l. El tratamiento de quimioterapia  
comenzó 15 días después de la implantación del tumor. La administración de carboplatino (Paraplatin®) fue o bien de  
20 40 mg/kg ip en 250 ml (dosis alta) o de 15 mg/kg en 250  $\mu$ l (dosis baja), y la administración de paclitaxel (Taxol®) se  
realizó o bien de 8 mg/kg ip en 250  $\mu$ l (dosis alta) o en 3 mg/kg por vía intraperitoneal en 250 ml (dosis baja). Se  
administró carboplatino solamente una vez por semana por un total de 4 tratamientos, y paclitaxel se administró q2w  
por un total de dos tratamientos. En los días del tratamiento, el paclitaxel se administró primero y el carboplatino se  
15 administró dos horas después. Comenzando 18 días después de la implantación del tumor, los ratones en los grupos  
seleccionados se trataron por vía intraperitoneal con 100  $\mu$ g de plásmido IL-12 formando complejo con PPC en una  
relación N.P de 11:1 en un volumen de 500  $\mu$ l. La administración del plásmido se repitió semanalmente por un total de  
cuatro tratamientos. Todo el ciclo de tratamiento se repitió tres veces (12 semanas en total), y se vigiló la  
20 supervivencia de los animales. Como se indica en la FIG. 15, 30% del grupo de quimioterapia de alta dosis murieron  
debido a toxicidad relacionada con el tratamiento (es decir, antes de alcanzar 40 gramos) en comparación con 0% de  
muerte relacionada con el tratamiento en el grupo de IL-12/PPC + quimioterapia de baja dosis, en el grupo de  
quimioterapia de baja dosis o en el grupo de tratamiento con IL-12/PPC solamente. Estos resultados demuestran que  
en comparación con un régimen de quimioterapia de alta dosis, la combinación de IL-12/PPC con quimioterapia de  
baja dosis produce relativamente menos muertes relacionadas con el tratamiento, pero eficacia anticáncer similar  
(FIG. 12).

25

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de cáncer o trastornos hiperproliferativos, que comprende:
- 5 (a) un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en DNA plasmídico, siRNA, RNA sentido, RNA antisentido y ribozima, y un polímero de administración de genes; y
- (b) un agente farmacéutico antineoplásico, caracterizado porque
- (i) el polímero de administración de genes es un lipopolímero que comprende una cadena principal de polietilenimina (PEI) covalentemente unida a un polietilenglicol y a un colesterol; y
- 10 (ii) el agente farmacéutico se selecciona del grupo que consiste en fármacos quimioterapéuticos, fármacos antiangiogénicos, péptidos antineoplásicos, anticuerpos monoclonales y sus mezclas.
2. Una composición farmacéutica para uso médico según la reivindicación 1, en la que el colesterol está directamente unido a la cadena principal PEI o en la que el colesterol está covalentemente unido al espaciador de polietilenglicol, que a su vez está unido a la cadena principal PEI.
- 15 3. Una composición farmacéutica para uso médico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el ácido nucleico codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en interleucina-2, interleucina-4, interleucina-7, interleucina-12, IL-15, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$ , factor estimulante de colonias, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, agentes antiangiogénicos, TNF- $\alpha$ , eNOS, iNOS, IP10, p16, antígenos bacterianos, antígenos víricos, antígenos tumorales y cualquiera de sus combinaciones.
- 20 4. Una composición farmacéutica para uso médico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el agente farmacéutico es un agente quimioterapéutico o un agente antineoplásico seleccionado del grupo que consiste en adriamicina, bleomicina, cisplatino, carboplatino, doxorubicina, 5-fluorouracilo, paclitaxel, topotecán, carmustina, gemcitabina o cualquier agente quimioterapéutico relacionado de la misma clase y cualquiera de sus combinaciones.
5. Una composición farmacéutica para uso médico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el agente farmacéutico es un anticuerpo.
- 25 6. Una composición farmacéutica para uso médico según la reivindicación 5, en la que el agente farmacéutico es un anticuerpo antineoplásico seleccionado del grupo que consiste en anticuerpo CD20, anticuerpo HER2/neu, anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo del receptor del factor de crecimiento epidérmico y sus conjugados radioisotópicos.
- 30 7. Una composición farmacéutica para uso médico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el agente farmacéutico es un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en interleucina-2, interleucina-4, interleucina-7, interleucina-12, IL-15, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$ , factor estimulante de colonias, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, agentes antiangiogénicos, IP10, p16, eNOS, iNOS, TNF- $\alpha$ , antígenos bacterianos, antígenos víricos, antígenos tumorales y cualquiera de sus combinaciones.
- 35 8. Una composición según se define en la reivindicación 1 para uso en la inhibición *in vivo* del crecimiento y metástasis de células tumorales, y en la mejoría de la supervivencia de mamíferos con cáncer, donde los componentes (a) y (b) de la composición se administran juntos o separados.
- 40 9. La composición para uso médico según la reivindicación 8, en la que el ácido nucleico es un plásmido de DNA que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en interleucina-2, interleucina-4, interleucina-7, interleucina-12, interleucina-15, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$ , factor estimulante de colonias, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, agentes antiangiogénicos, timidina cinasa, p53, IP10, p16, TNF- $\alpha$ , ligando Fas, antígenos tumorales, antígenos víricos, antígenos bacterianos o cualquiera de sus combinaciones.
10. La composición para uso médico según la reivindicación 8, en la que el ácido nucleico es un plásmido de DNA que codifica interleucina-12.
- 45 11. La composición para uso médico según la reivindicación 8, en la que el ácido nucleico es un plásmido de DNA sencillo que codifica más de una proteína seleccionada en cualquier combinación del grupo que consiste en interleucina-2, interleucina-4, interleucina-7, interleucina-12, interleucina-15, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$ , factor estimulante de colonias, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, agentes antiangiogénicos, timidina cinasa, p53, IP10, p16, TNF- $\alpha$ , ligando Fas, antígenos tumorales, antígenos víricos y antígenos bacterianos.
- 50 12. La composición para uso médico según la reivindicación 8, en la que el ácido nucleico es un plásmido de DNA que codifica un RNA de horquilla corta diseñado para inhibir la expresión de una proteína requerida para el crecimiento y la metástasis de tumores.

13. La composición para uso médico según la reivindicación 8, en la que el ácido nucleico es un RNA seleccionado del grupo que consiste en siRNA, RNA sentido, RNA antisentido, una ribozima y cualquiera de sus combinaciones, diseñada para inhibir la expresión de una proteína requerida para el crecimiento y la metástasis de tumores.
- 5 14. La composición para uso médico según la reivindicación 8, en la que el ácido nucleico es un plásmido de DNA sencillo que codifica un RNA de horquilla corta y una proteína seleccionada del grupo que consiste en interleucina- 2, interleucina-4, interleucina-7, interleucina-12, interleucina-15, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$ , factor estimulante de colonias, factor estimulante de granulocitos y macrófagos, agentes antiangiogénicos, timidina cinasa, p53, IP10, p16, TNF- $\alpha$ , eNOS, iNOS, ligando Fas, antígenos tumorales, antígenos víricos, antígenos bacterianos o cualquiera de sus combinaciones.
- 10 15. La composición para uso médico según la reivindicación 8, en la que el ácido nucleico es un RNA seleccionado del grupo que consiste en un siRNA, RNA sentido, RNA antisentido o una ribozima y un DNA plasmídico que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en interleucina-2, interleucina-4, interleucina-7, interleucina-12, interleucina-15, interferón- $\alpha$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\gamma$ , factor estimulante de colonias, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, agentes antiangiogénicos, timidina cinasa, p53, IP10, p16, TNF- $\alpha$ , eNOS, iNOS, ligando Fas, antígenos tumorales, antígenos víricos, antígenos bacterianos o cualquiera de sus combinaciones.
- 15 16. La composición para uso médico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, en la que la polietilenimina tiene una configuración lineal o ramificada con un peso molecular de 100-500.000 Daitons.
17. La composición para uso médico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16, en la que el polietilenglicol tiene un peso molecular comprendido entre 50 y 20.000 Daitons.
- 20 18. La composición farmacéutica para uso médico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 17, en la que la relación molar de polietilenglicol a PEI está dentro de un intervalo de 0,1:1 a 500:1.
19. La composición para uso médico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 17, en la que la relación molar del colesterol a PEI está dentro de un intervalo de 0,1:1 a 500:1.
- 25 20. La composición para uso médico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 19, en la que la polietilenimina comprende además un resto diana, donde el resto diana está directamente unido a la cadena principal de polietilenimina o está unido a través del enlazador de polietilenglicol.
- 30 21. La composición para uso médico según la reivindicación 20, en la que el resto diana se selecciona del grupo que consiste en transferrina, asialoglucoproteína, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, lipoproteínas de baja densidad lipoproteínas, interleucinas, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, factores de células madre, eritropoyetina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, asialoorosomucoide, manosa-6-fosfato, manosa, Lewis<sup>x</sup> y sialilo Lewis\*, N-acetil-lactosamina, folato, galactosa, lactosa y trombomodulina, agentes fusogénicos tales como polimixina B y hemaglutinina HA2, agentes lisosomotrópicos, señales de localización de núcleo (NLS) y cualquiera de sus combinaciones.
- 35 22. La composición para uso médico según la reivindicación 20 o la reivindicación 21, en la que la relación molar del lipopolímero y el resto diana está dentro del intervalo de 1:0,1 a 1:100.
23. La composición para uso médico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 22, en la que el ácido nucleico forma complejo con el lipopolímero en moles de nitrógeno en el lipopolímero a moles de fosfato en el DNA en una relación molar de 0,1:100 a 100:1.
- 40 24. La composición para uso médico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 23, en la que el agente farmacéutico se administra por administración intravenosa, intratumoral, oral o intraperitoneal.
25. La composición para uso médico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 24, en la que el ácido nucleico y el polímero de administración de genes se administran antes de la administración del agente farmacéutico.
26. La composición para uso médico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 24, en la que dichos ácido nucleico y polímero se administran después de la administración del agente farmacéutico.
- 45 27. La composición para uso médico según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 26, en la que el agente farmacéutico se selecciona del grupo que consiste en fármacos quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, péptidos antineoplásicos, anticuerpos monoclonales y sus mezclas para el tratamiento de cáncer o trastornos hiperproliferativos; preferiblemente un agente quimioterapéutico o un agente antineoplásico seleccionado del grupo que consiste en adriamicina, bleomicina, cisplatino, carboplatino, doxorubicina, 5-fluorouracilo, paclitaxel, topotecán,
- 50 carmustina, gemcitabina o cualquier agente quimioterapéutico relacionado de la misma clase y cualquiera de sus combinaciones.

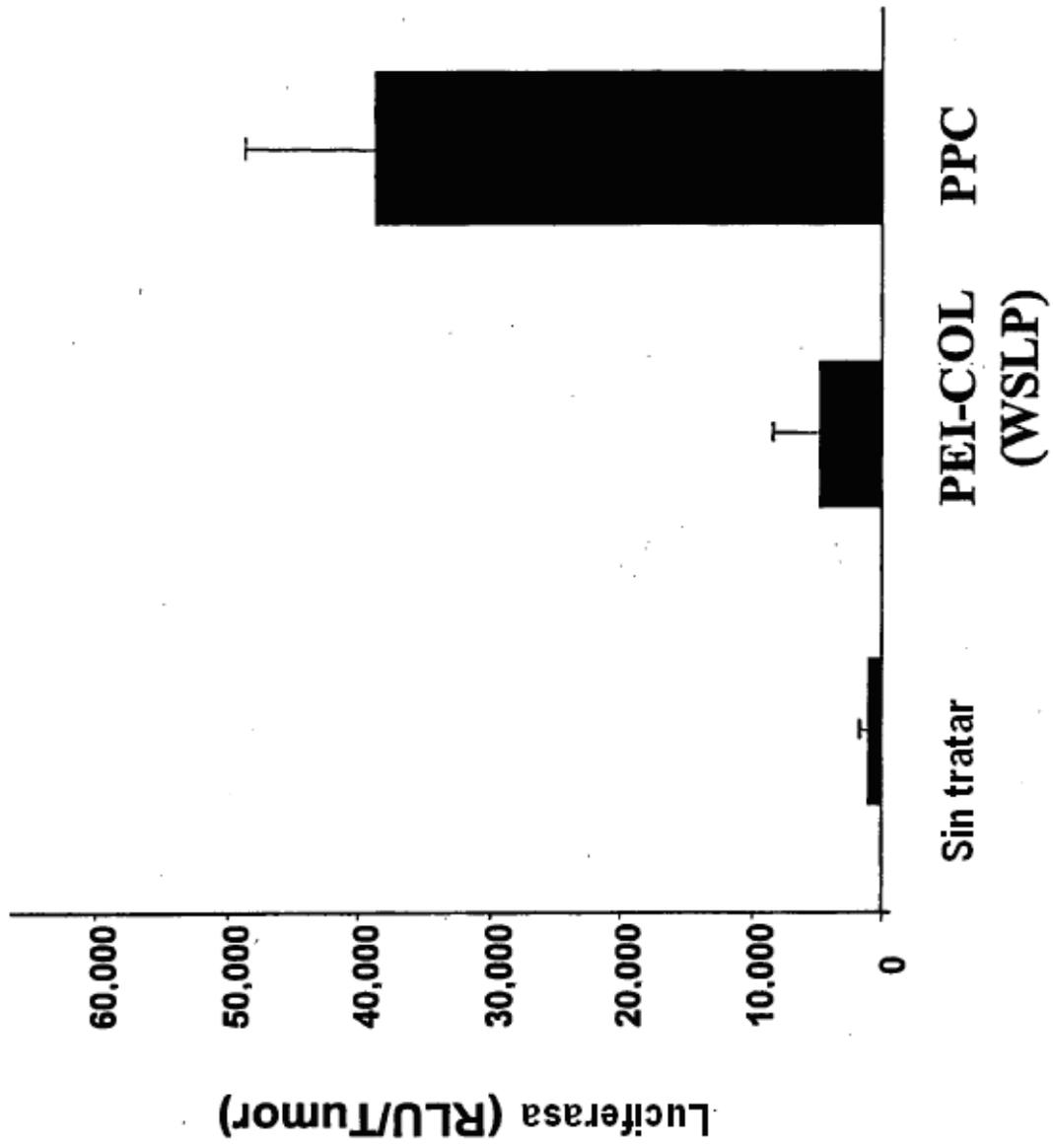


Fig. 1

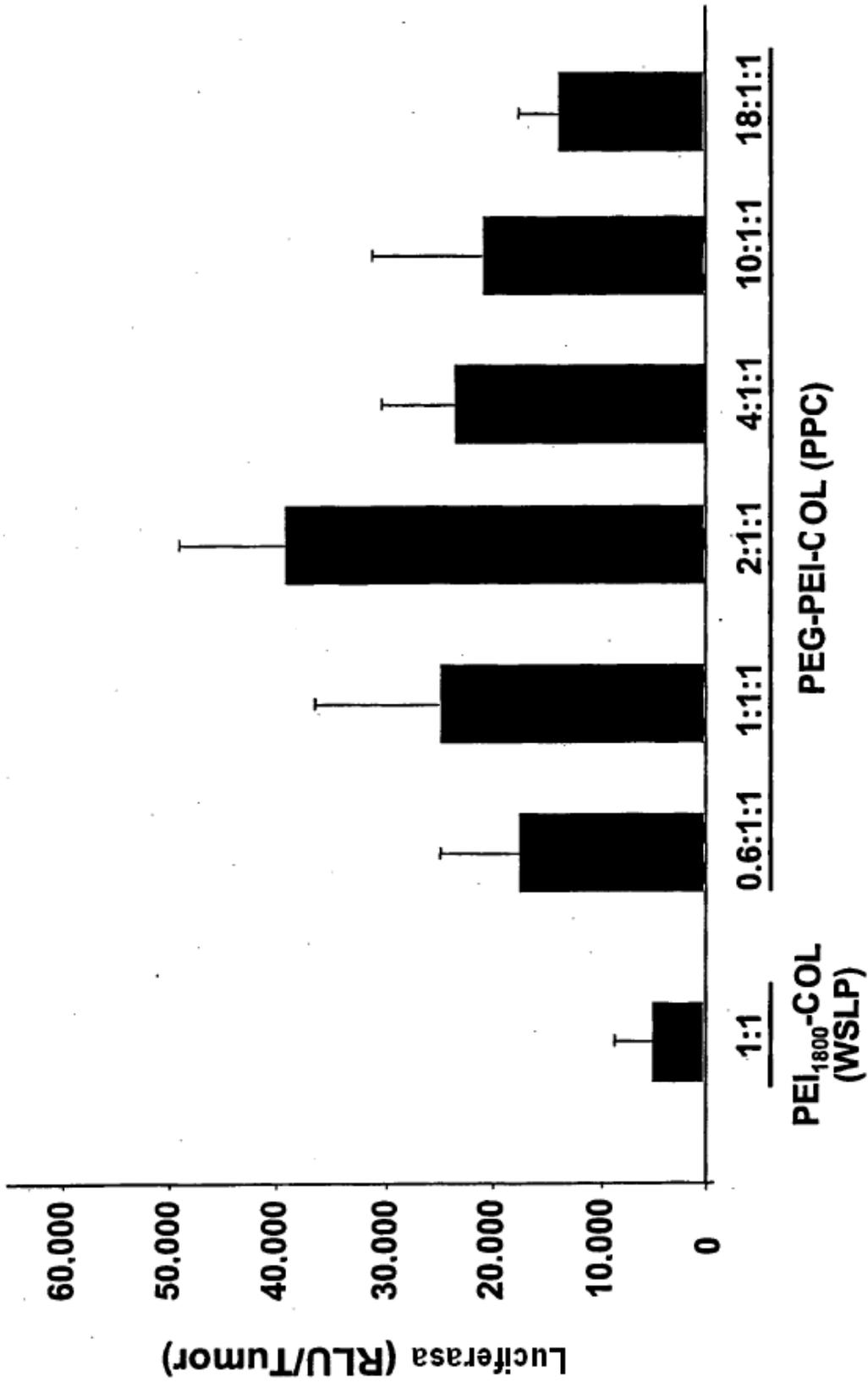


Fig. 2

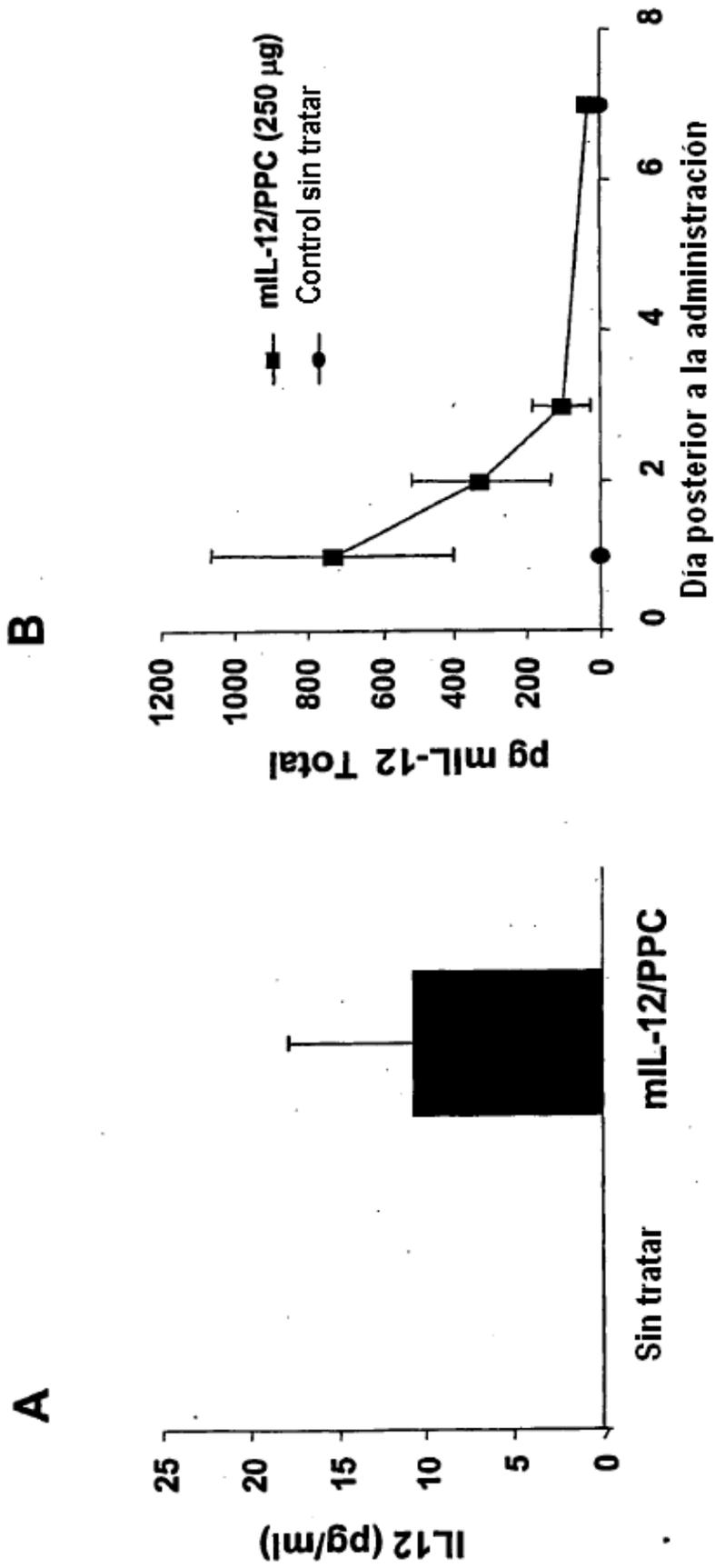


Fig. 3

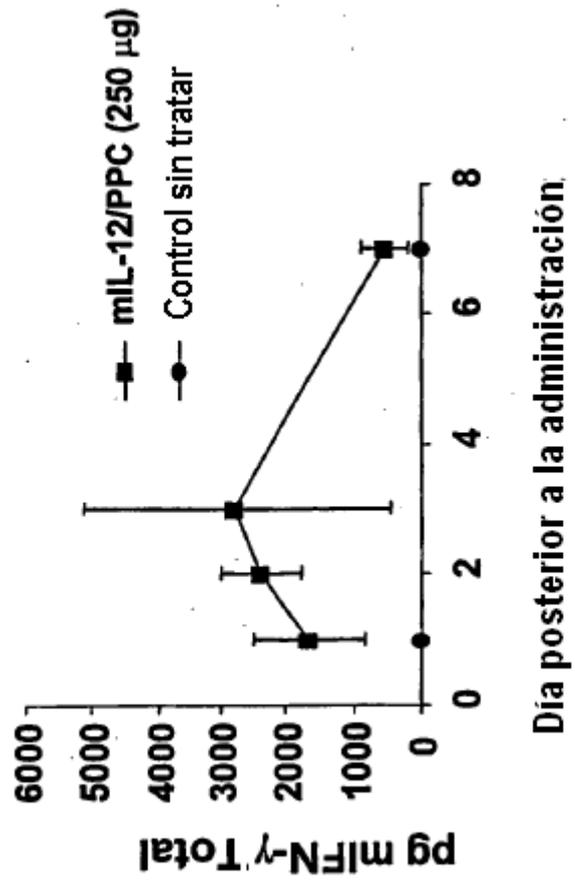


Fig. 4

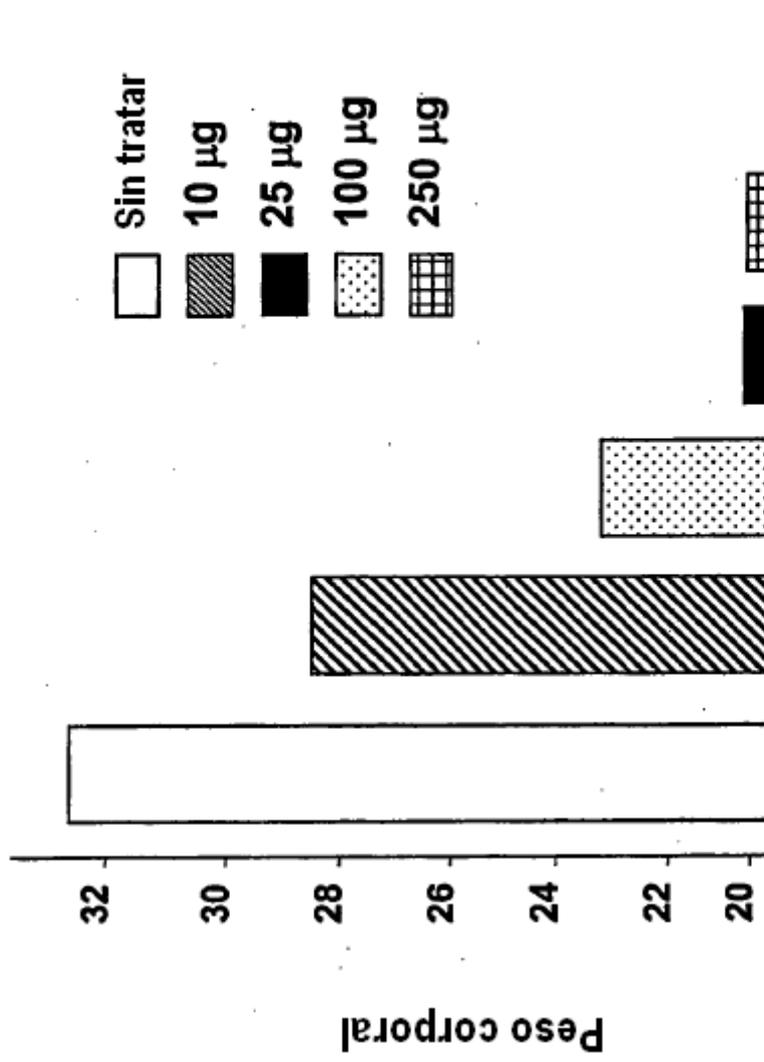


Fig. 5

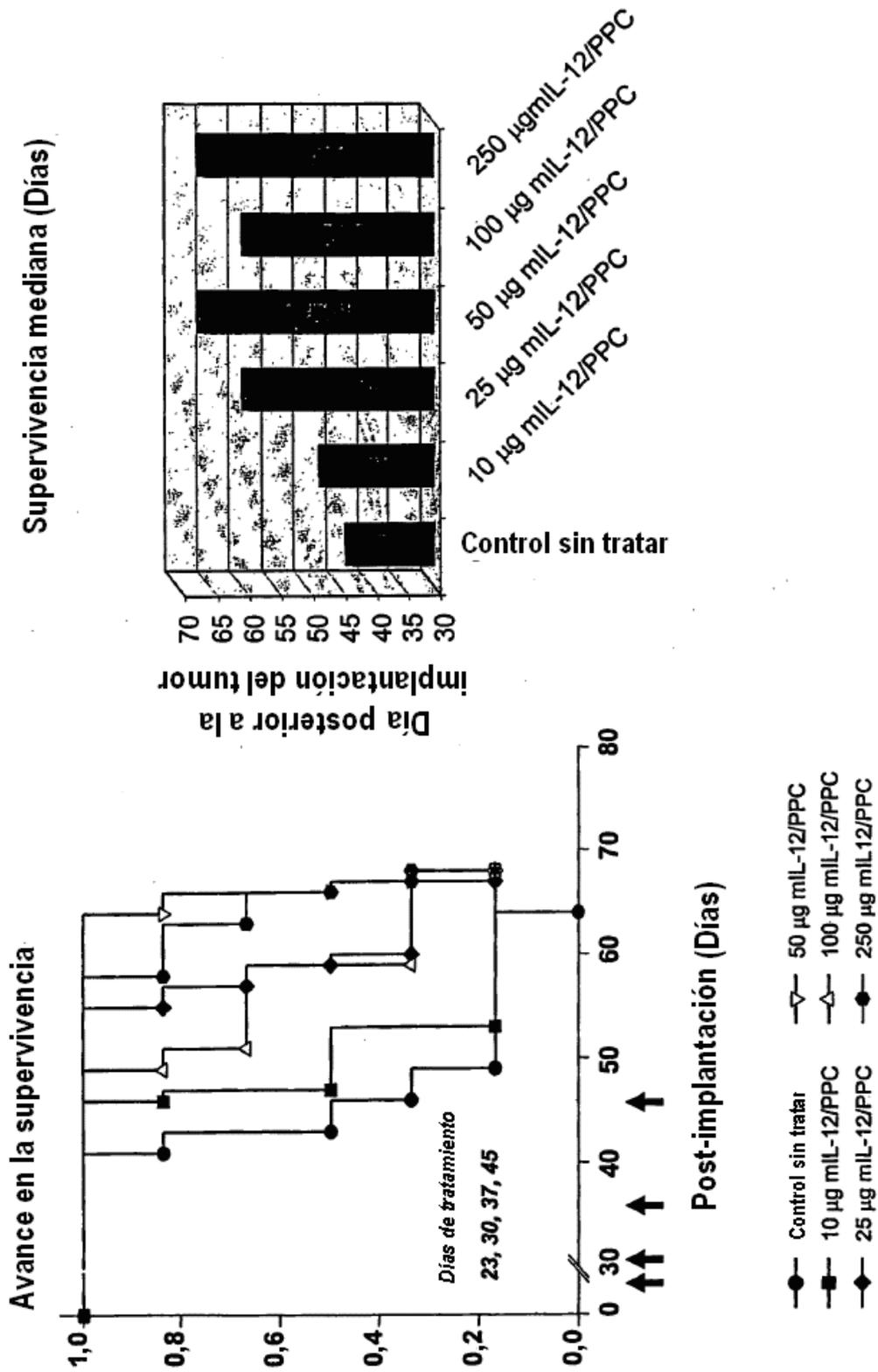


Fig. 6

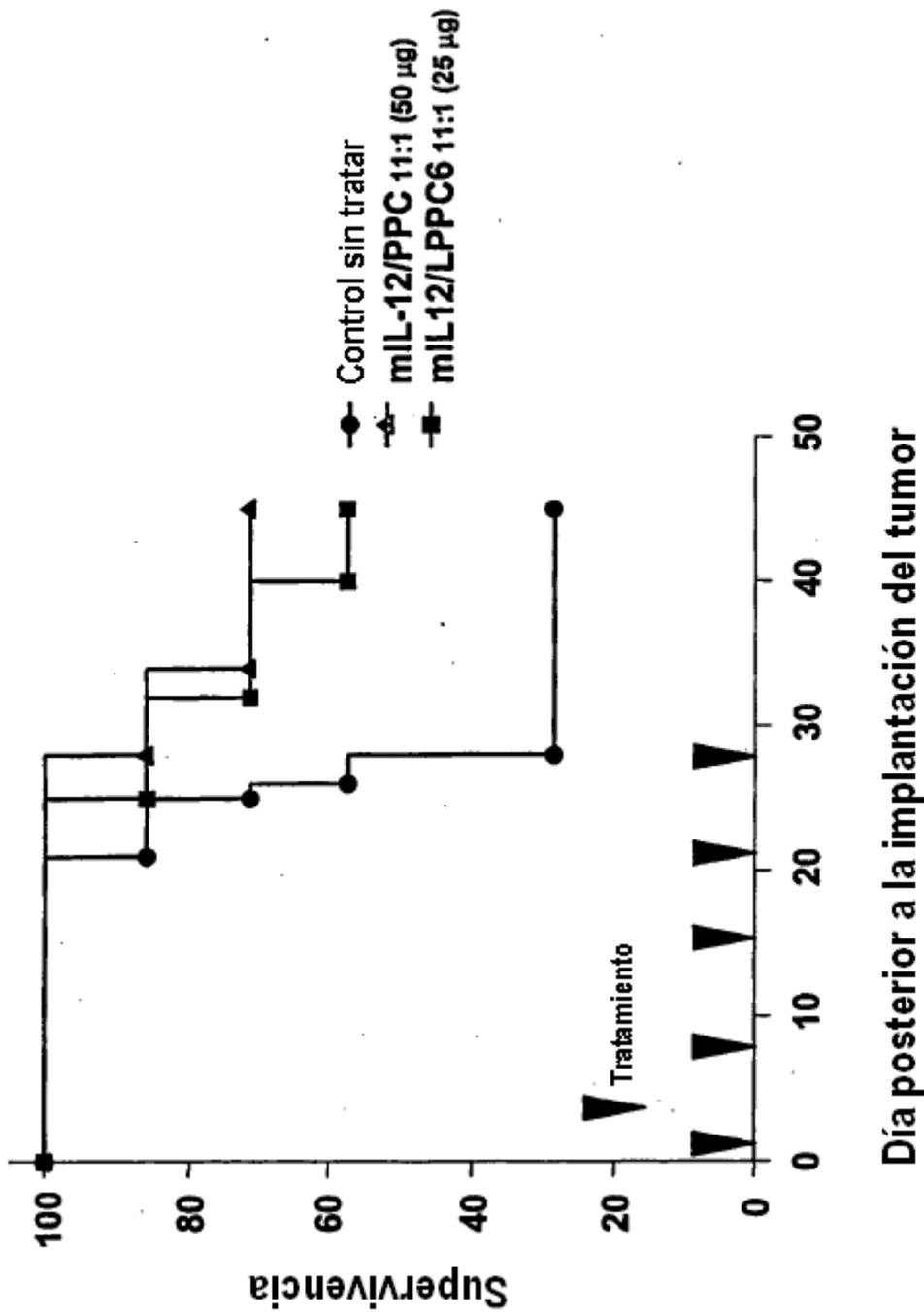
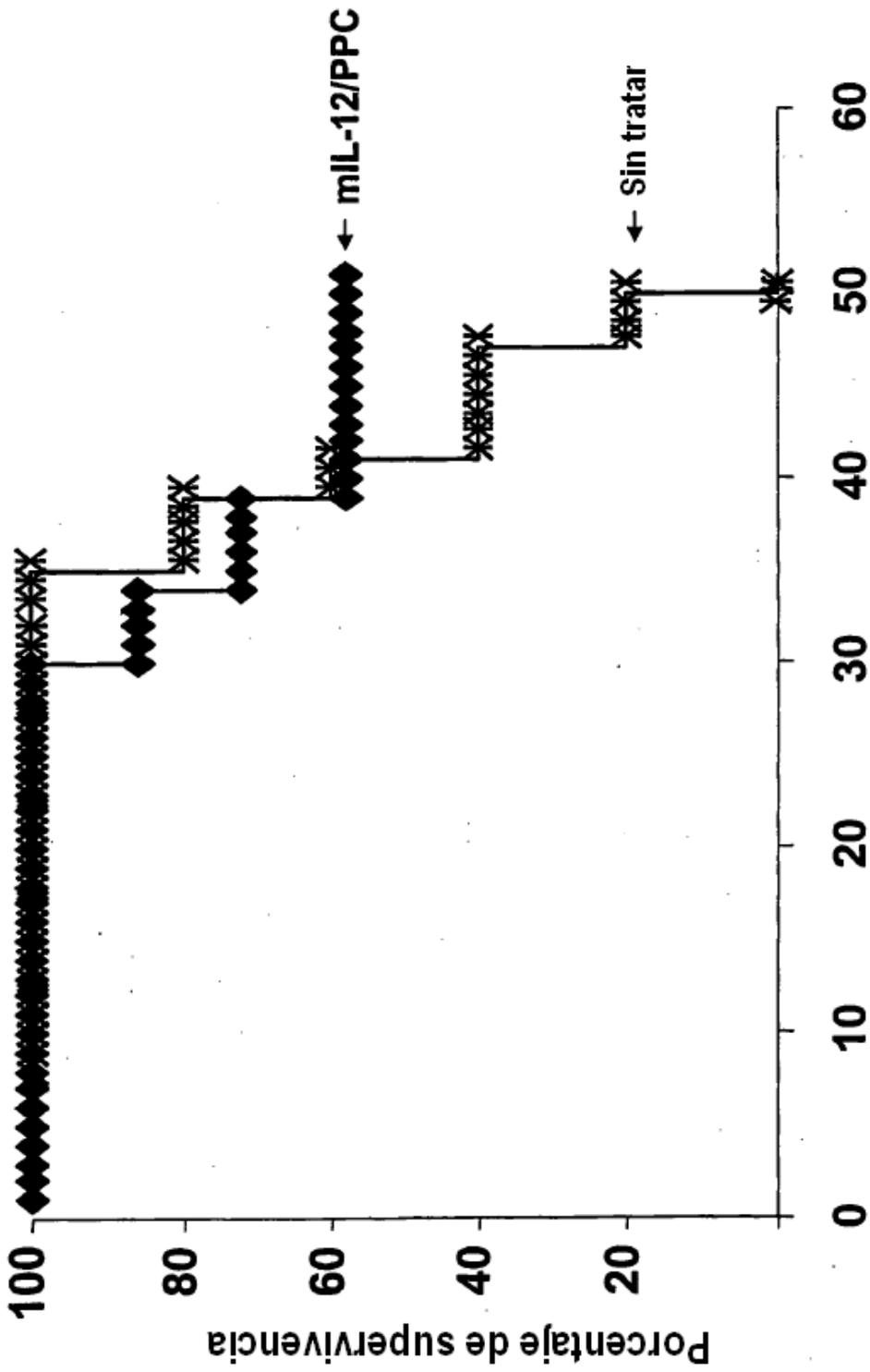


Fig. 7



Días posteriores a la inoculación del tumor

Fig. 8

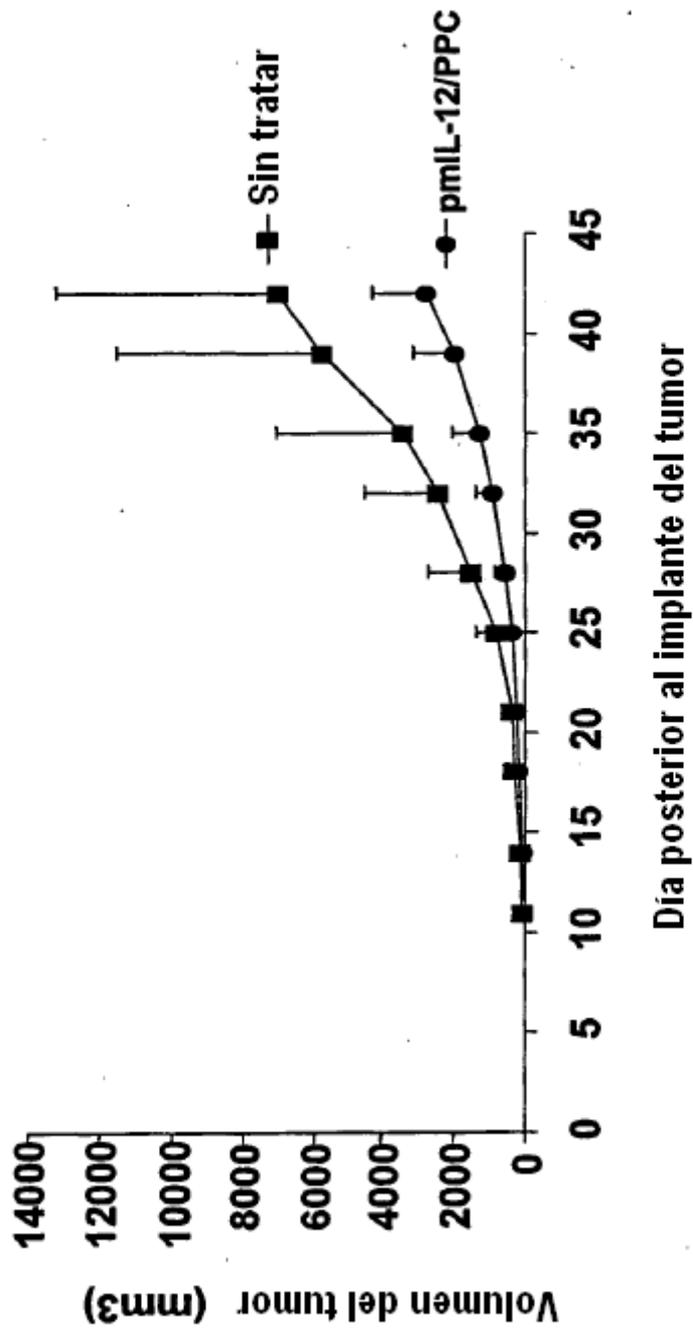


Fig. 9

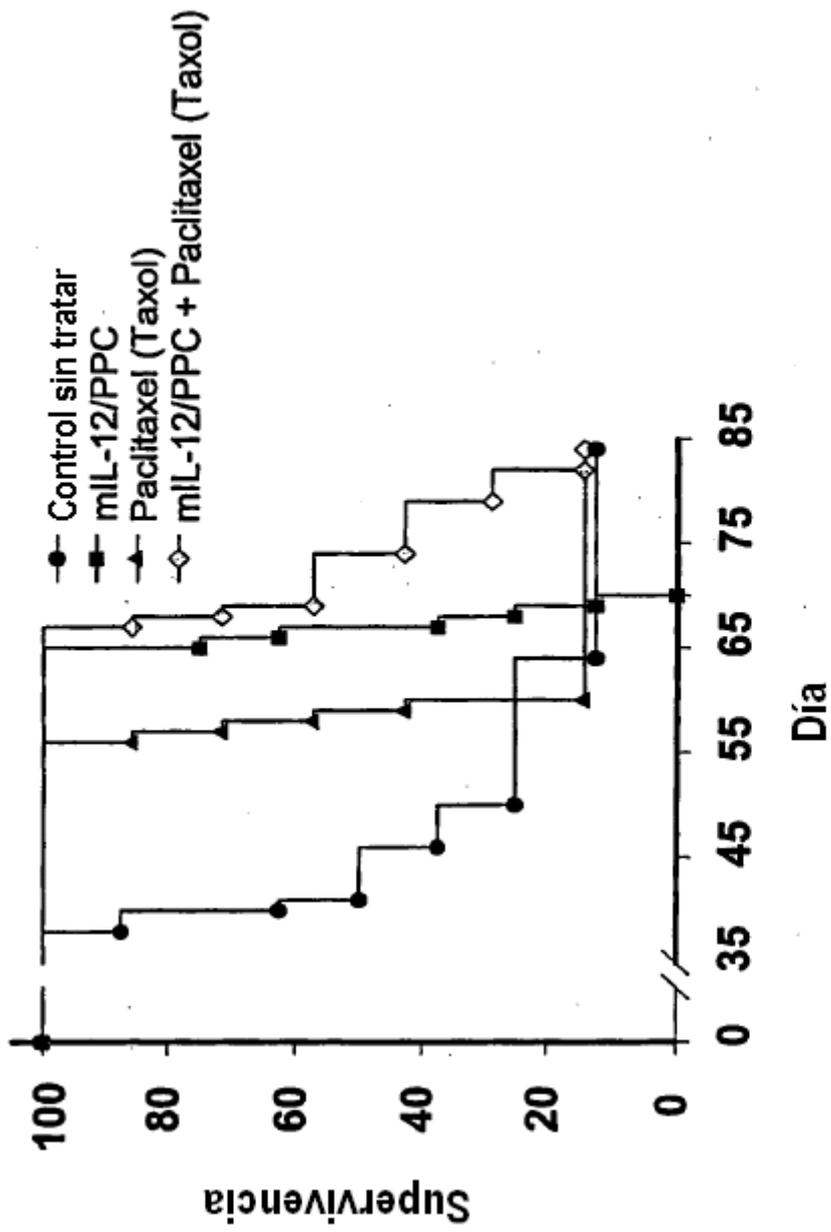


Fig. 10

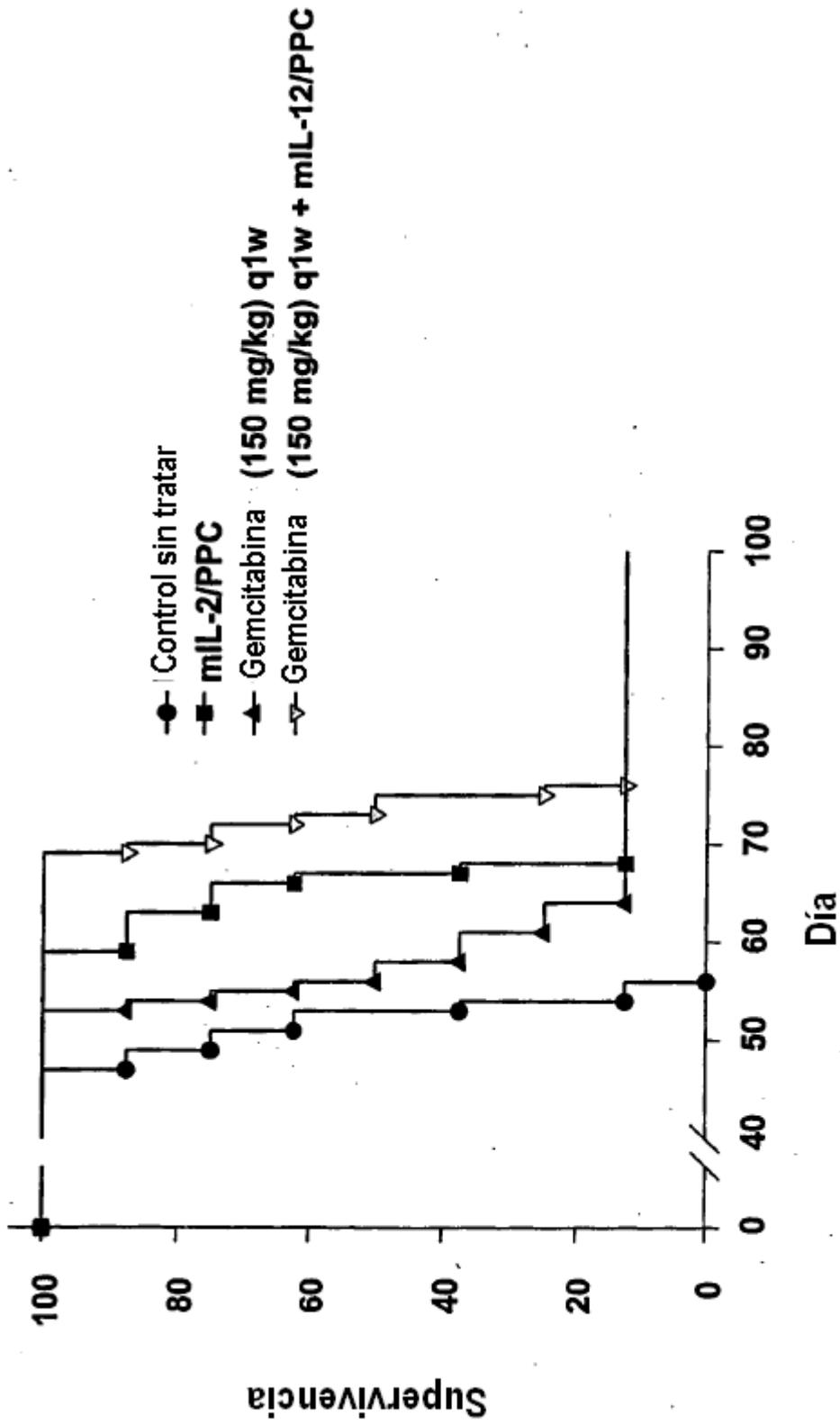


Fig. 11

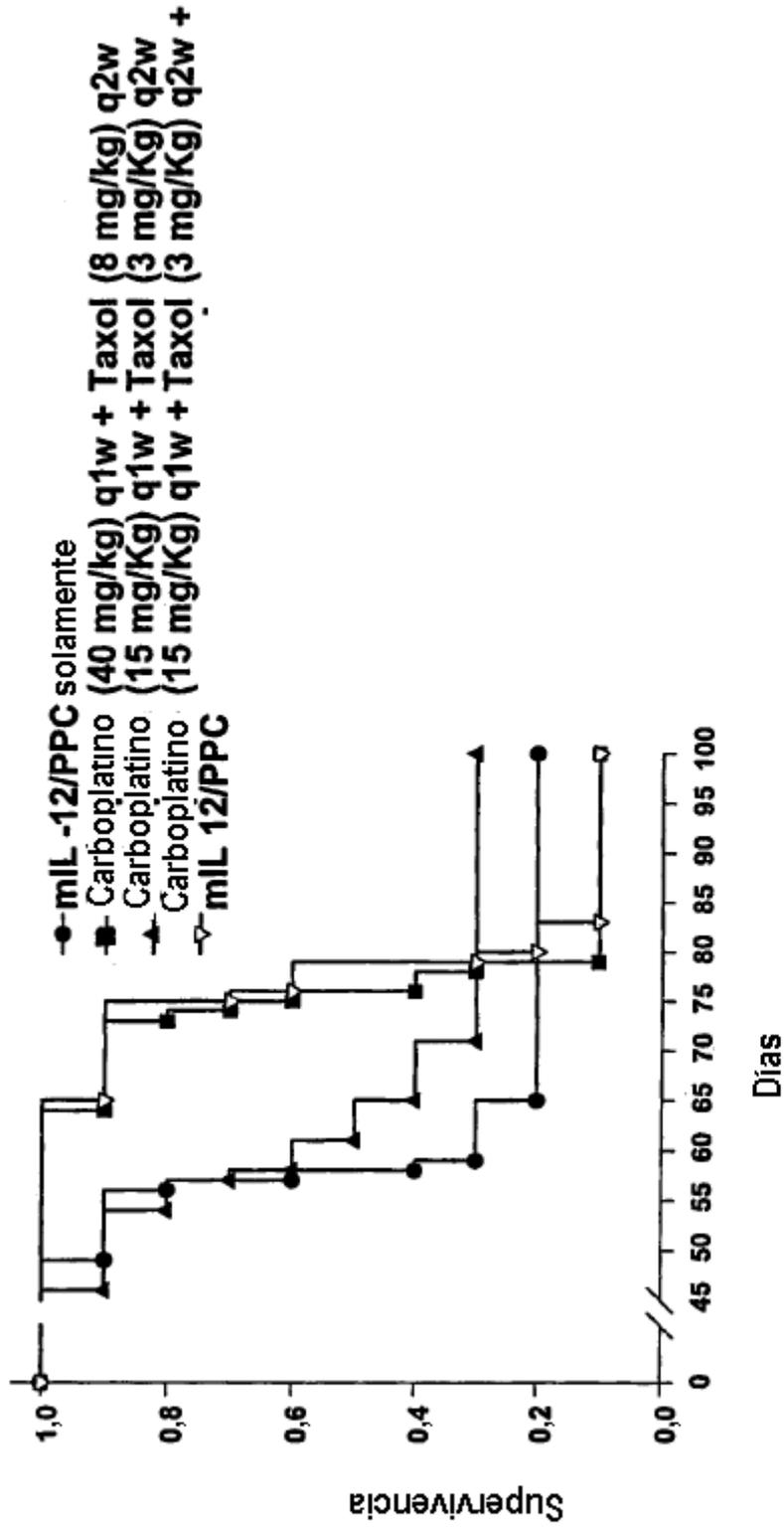


Fig. 12

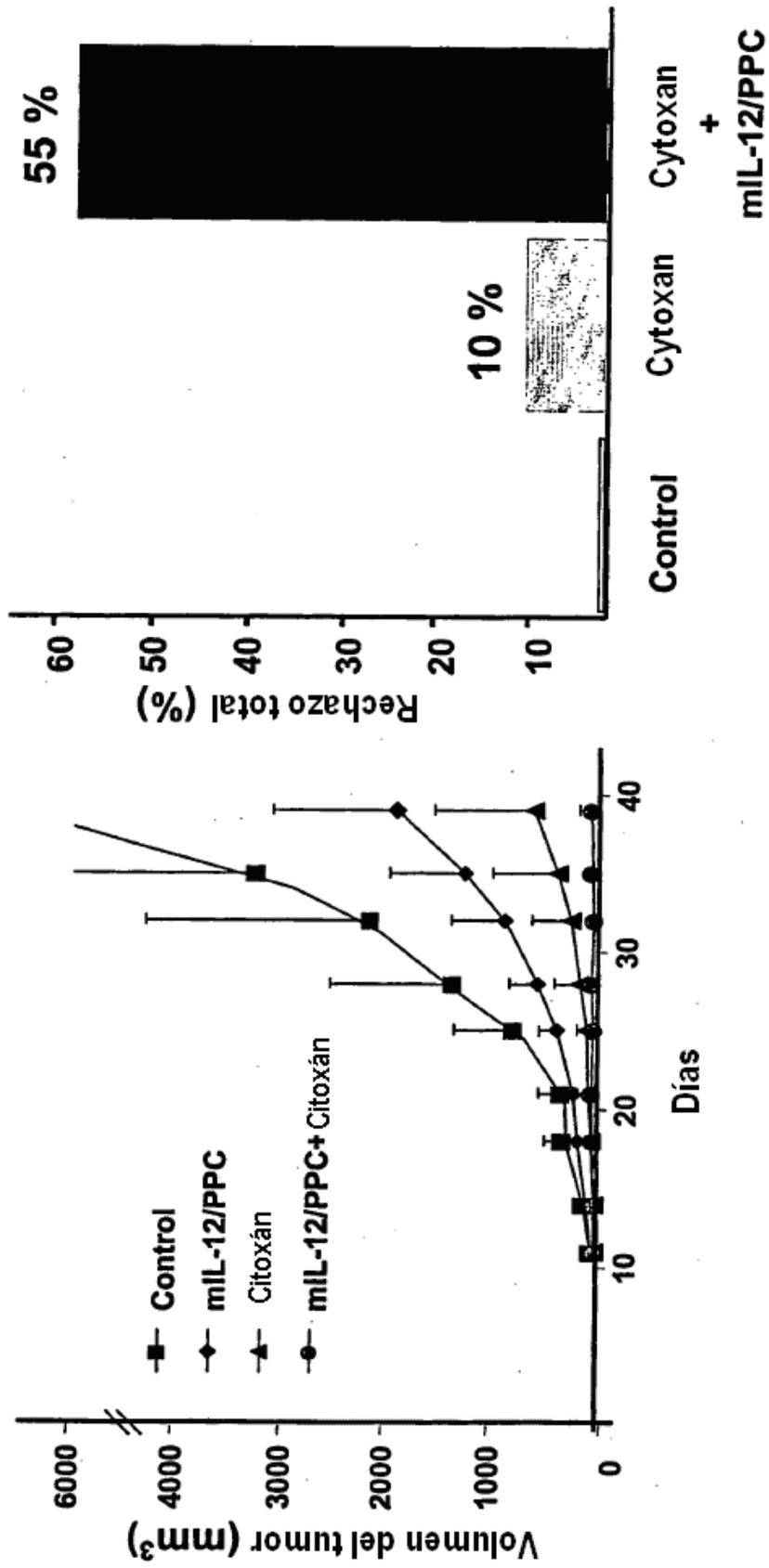
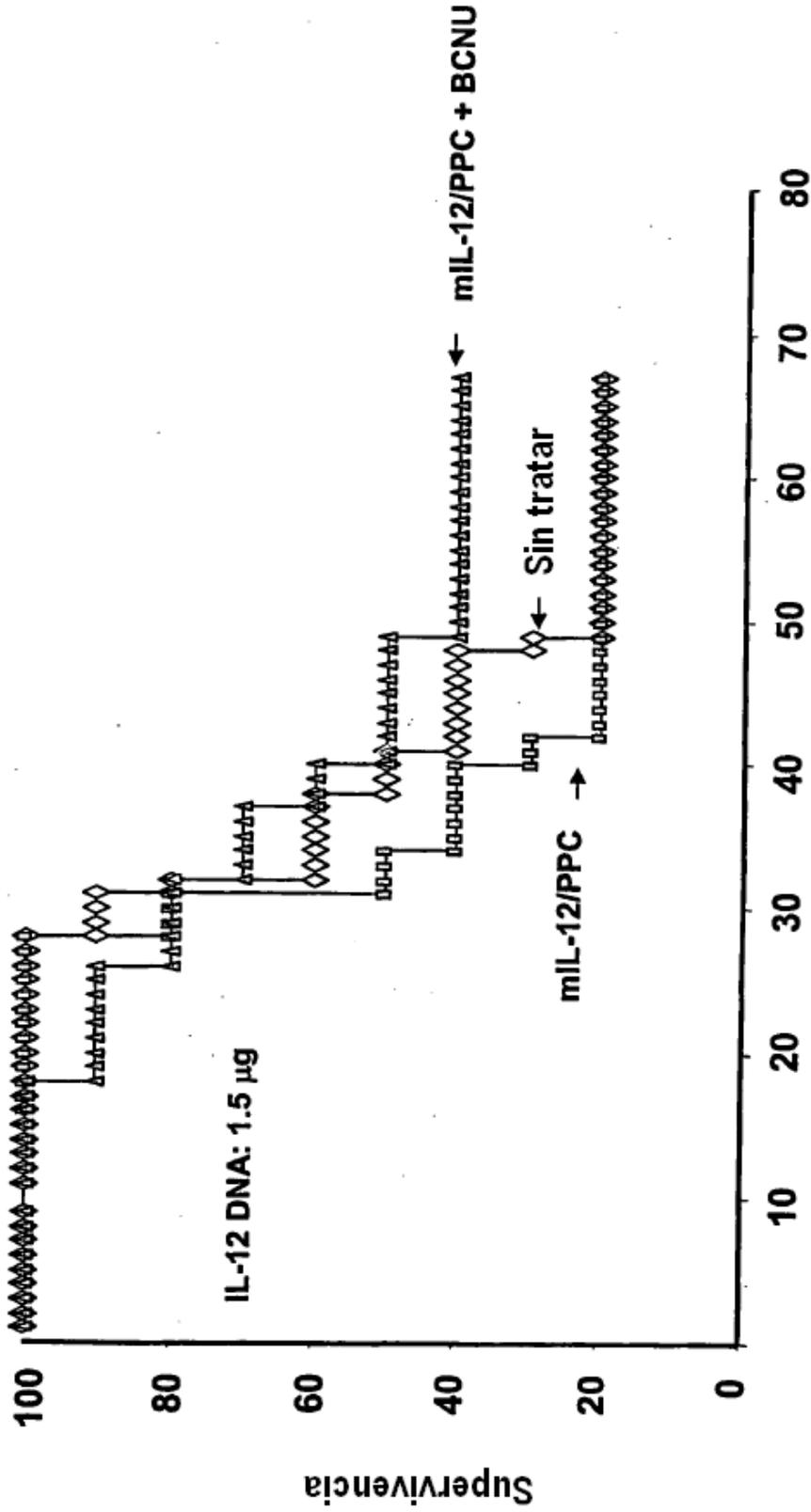


Fig. 13



Días posteriores a la inoculación del tumor

Fig. 14

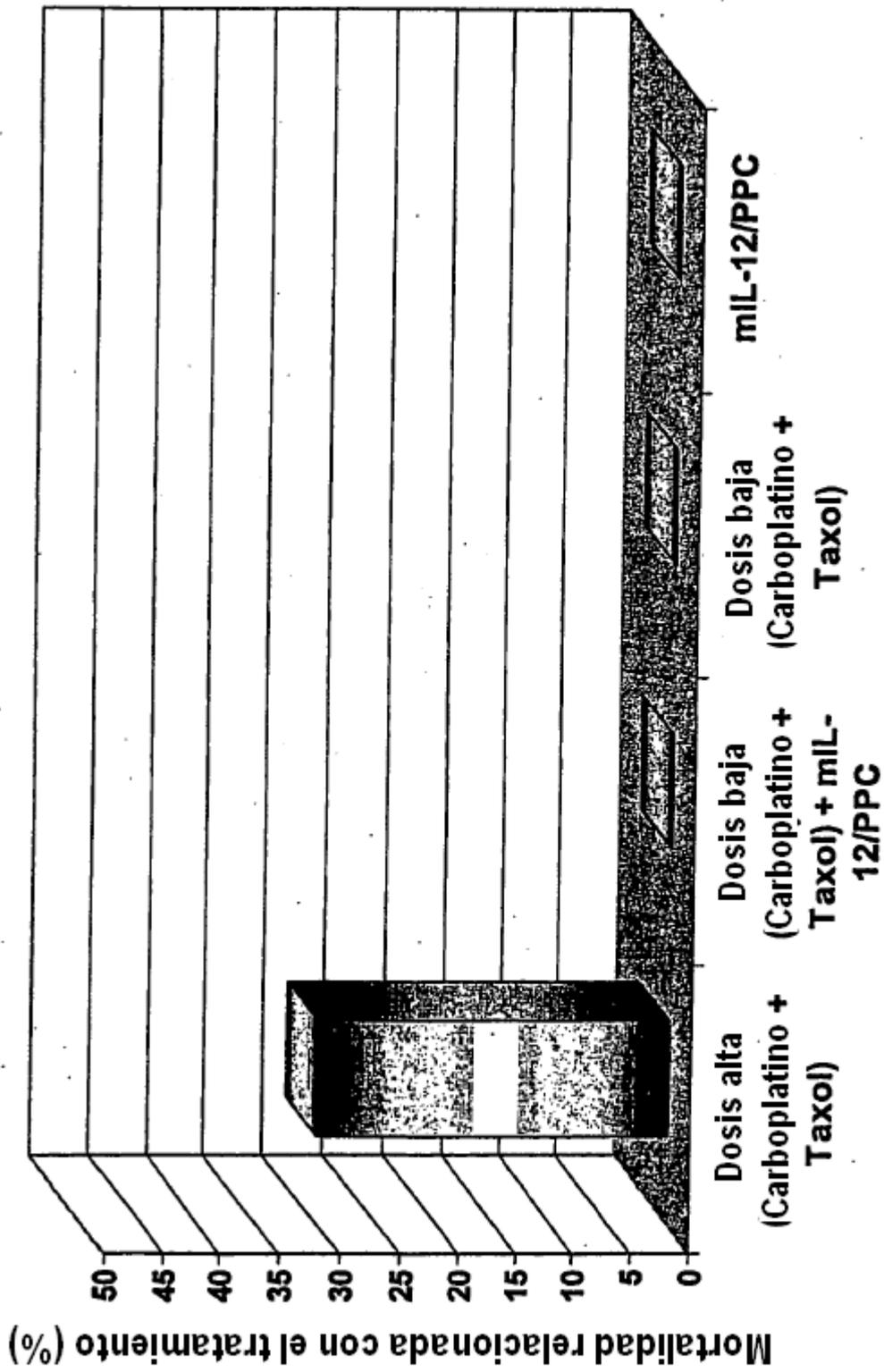


Fig. 15