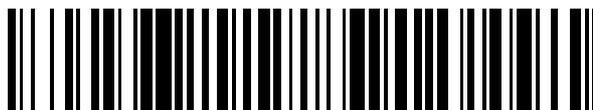


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 091**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2004 E 04748955 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 1655036**

54 Título: **Método para el tratamiento de enfermedades oncológicas**

30 Prioridad:

14.07.2003 WO PCT/RU03/00304

12.03.2004 RU 2004108061

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.10.2013

73 Titular/es:

**CLS THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
Bordeaux Court Les Echelons St Peter Port
Guernsey GY1 3DR, GB**

72 Inventor/es:

**GENKIN, DMITRY DMITRIEVICH;
TETS, VIKTOR VENIAMINOVICH y
TETS, GEORGY VIKTOROVICH**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 427 091 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

Método para el tratamiento de enfermedades oncológicas

5 Sector técnico

La presente invención está relacionada con la medicina y la veterinaria y se puede utilizar para el tratamiento, en general, de tumores sólidos. Se refiere a la utilización de ADNasa humana recombinante en el tratamiento de un paciente que tiene cáncer.

10

Técnica anterior

15 Las poblaciones de células tumorales, que se desarrollan en el cuerpo del paciente, presentan una variabilidad genética muy elevada que supera a la de las células sanas. La variabilidad genética de las poblaciones de células cancerosas permite la generación de fenotipos, que son insensibles para el control inmunológico y morfogenético y que presentan la capacidad de invasión y metástasis y son insensibles a la terapia para el cáncer. Se considera que la selección y expansión clonal de células cancerosas son la base de la "progresión" biológica y clínica de los tumores. Esta es la razón por la que la estrategia de la terapia moderna del cáncer se basa en el principio de destruir clones de células cancerosas en el cuerpo del paciente con quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, bioterapia, métodos quirúrgicos y la combinación de los mismos.

20

La quimioterapia, radioterapia, bioterapia y, de manera más reciente, la inmunoterapia son los métodos no quirúrgicos más utilizados en el tratamiento de las enfermedades cancerosas y están dirigidos a la destrucción, daño o desactivación del ADN intracelular de células cancerosas.

25

La estrategia con quimioterapia se basa en compuestos conocidos: para preparaciones de platino véase "Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity" ("Mecanismos moleculares implicados en la citotoxicidad del cisplatino"), Jordan P, Carmo-Fonseca M, Cell Mol Life Sci, agosto de 2000, volumen 57: págs. 1229-35, para antibióticos de antraciclina, véase "Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review" ("Daunorrubicina y doxorubicina, antibióticos de antraciclina, una revisión fisicoquímica y biológica"), Aubel-Sadron G, Londos-Gagliardi D, Biochimie, mayo de 1984, volumen 66: págs. 333-52, para agentes alquilantes, véase "An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology" ("Resumen de la farmacología de la ciclofosfamida y la ifosfamida"), y para podofilotoxinas, véase "Podophylotoxins: current status and recent developments" (Podofilotoxinas: estado actual y desarrollos recientes"), Damayanthi Y, Lown JW, Curr Med Chem, 5 de junio de 1998: volumen 3, págs. 205-52.

30

35

Se han dado a conocer métodos de radioinmunoterapia que permiten irradiar el ADN intracelular de núcleos de células cancerosas por partículas alfa a partir de emisores alfa que se liberan de manera especial en células cancerosas para incrementar el efecto en el ADN intracelular, véase "Targeted alpha therapy: evidence for potential efficacy of alpha-immunoconjugates in the management of micrometastatic cancer" ("Terapia de reconocimiento de alfa: evidencia de la eficacia potencial de inmunocombinados alfa en el tratamiento de cáncer micrometastático"), Allen BJ, Australas Radiol, noviembre de 1999, volumen 43: págs. 480-6.

40

Existen métodos bioterapéuticos e inmunoterapéuticos, que están dirigidos a la inducción de la apoptosis de células cancerosas, el proceso de la muerte de una célula cancerosa, que empieza con la activación de nucleasas intracelulares con la posterior degradación de ADN intracelular de la célula tumoral, por ejemplo, mediante la administración de construcciones genoterapéuticas, que comprenden genes que inducen la apoptosis, véase "Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results" ("Prueba en fase I de la terapia con el gen p53 mediada por adenovirus para glioma recurrente: resultados biológicos y clínicos") Lang FF, Bruner JM, Fuller GN, Aldape K, Prados MD, Chang S, Berger MS, McDermott MW, Kunwar SM, Junck LR, Chandler W, Zwiebel JA, Kaplan RS, Yung WK, J Clin Oncol, 1 de julio de 2003 21:13 2508-18, o genes que codifican los factores que activan las nucleasas que desencadenan la apoptosis, véase "Adenovirus-mediated transfer of caspase-8 augments cell death in gliomas: implication for gene therapy." ("La transferencia mediada por adenovirus de la caspasa-8 aumenta la muerte celular en gliomas: implicación de la terapia génica") Shinoura N, Koike H, Furitu T, Hashimoto M, Asai A, Kirino T, Hamada H, Hum Gene Ther, 20 mayo de 2000, 11: 8 1123-37, o mediante vacunas contra el cáncer, véase "Vaccine-induced apoptosis: a novel clinical trial end point?" ("Apoptosis inducida por vacunas: ¿un nuevo punto final de las pruebas clínicas?") Amin S, Robins RA, Maxwell-Armstrong CA, Scholefield JH, Durrant LG, Cancer Res, junio de 2000, 60: 3132-6.

45

50

55

60

Es conocida en la patente de Estados Unidos 6.455.250 la utilización de la endonucleasa Endo SR para el tratamiento de enfermedades del cáncer mediante su administración intracelular en las células diana.

De los métodos indicados anteriormente, se seleccionó como prototipo la quimioterapia con el etopósido 4-demetilipodofilotoxin-(4,6-O-R)-etiliden)-b-D-glucopiranosido.

65

La topoisomerasa II es una enzima celular esencial que regula muchos aspectos de la función del ADN. La enzima

es responsable de la interconversión de diferentes formas topológicas del ADN intracelular mediante la generación de roturas transitorias de ADN de doble cadena. El etopósido, como inhibidor de la topoisomerasa II, incrementa el nivel intracelular de los complejos "ADN roto-topoisomerasa II".

5 El resultado de la influencia de este fármaco es la acumulación de roturas de ADN intracelular de doble cadena que conduce a la muerte celular, véase "Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice" ("Topoisomerasa II como diana para fármacos anticancerígenos: cuando las enzimas dejan de ser buenas"), Fortune JM, Osheroff N., Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 2000, volumen 64: págs. 221-53.

10 El inconveniente del método prototipo, así como de cualquier otro método conocido, es su eficacia baja. Esto se explica de la siguiente manera. El método prototipo, así como otros métodos conocidos, implican la célula cancerosa y, principalmente, el ADN intracelular como diana terapéutica.

La experiencia de dicha terapia constata que:

15 - debido a la gran variabilidad genética, las células cancerosas se vuelven, como regla general, insensibles a la terapia antes de ser eliminadas de manera adecuada mediante la utilización del método;
 - el ADN intracelular es una diana de estrategia difícil y conduce a la necesidad de una quimioterapia antineoplásica con una dosificación elevada y/o la necesidad de sistemas de liberación complicados (sistemas de liberación de fármacos). Además, el método prototipo que influye en el ADN intracelular de células cancerosas también daña el ADN de células sanas y esa es la razón de su toxicidad elevada.

20 Sugihara S. y otros dan a conocer que la introducción sistémica de ADNasa I pancreática bovina (0,1 unidades Kunitz (KU) por ratón por día) podría ralentizar el desarrollo de metástasis en el hígado. Los autores dan a conocer que el efecto de la ADNasa sola no es satisfactorio y requiere la combinación con la extracción quirúrgica del tumor primario (Sugihara S. y otros, British Journal of Cancer. Nature Publishing Group, London, GB, volumen 67, No. 1, 1 de enero de 1993, páginas 66-70; XP008086562|ISSN: 0007-0920).

Descripción de la invención

30 La solución al objetivo de desarrollar un método muy eficaz y poco tóxico en la terapia contra el cáncer es la base de la presente invención. Según la presente invención, este problema se resuelve mediante la administración en la circulación sistémica de un agente que destruye el ADN extracelular de la sangre; y dicho agente se puede introducir en la dosis que proporciona la alteración del perfil electroforético del ADN extracelular de la sangre, el cual podría detectarse mediante electroforesis en gel en campo de pulsos; el agente se puede introducir en unas dosis y un programa de administración que proporcionan una actividad hidrolítica en el plasma, medida en el plasma sanguíneo, que supera las 150 unidades Kunitz/litro de plasma sanguíneo, y este nivel se puede mantener durante más de 12 horas en 24 horas en total; el tratamiento se puede llevar a cabo de manera continua durante no menos de 48 horas; la enzima ADNasa se puede utilizar como agente para destruir el ADN extracelular de la sangre; mediante lo cual, como agente, se introduce de manera parenteral ADNasa I humana recombinante en dosis que varían desde 0,15 mg/día hasta 500 mg/día por día cada día durante un periodo de 5-360 días. El tratamiento puede durar toda la vida.

45 El hecho de la circulación de ADN extracelular en sangre de pacientes con cáncer se dio a conocer en un conjunto de artículos, véase (P. Anker y otros, Clinica Chimica Acta, volumen 313, 2001, págs. 143-146; Fedorov N.A. y otros, Bull. Exp. Biol. Med., volumen 102, 1986, págs. 281-283). En la patente de Estados Unidos 5.952.170 se dio a conocer la determinación del ADN extracelular en sangre para el diagnóstico y pronóstico de la evolución clínica de una enfermedad maligna. En las patentes de Estados Unidos 6.465.177 y 6.156.504, se dio a conocer la utilización de ADN extracelular de la sangre para la definición de mutaciones en oncogenes y fragmentos de tipo microsatélite de genes. También se dio a conocer la utilización de ADN extracelular de la sangre para estudiar la inestabilidad del genoma en tumores y la aplicación de los resultados para el diagnóstico, monitorización y pronóstico.

55 Además, hasta ahora no existía un análisis sistemático del espectro del ADN extracelular de la sangre y su función biológica. No se hallaron datos publicados de investigación del ADN extracelular de la sangre realizada sin el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR puede tergiversar el patrón del ADN extracelular de la sangre debido a la especificidad de los cebadores que se utilizan para la amplificación. Hasta muy recientemente, el análisis genético del ADN extracelular de la sangre se llevaba a cabo principalmente mediante PCR o hibridación por transferencia y se dirigía al estudio de cambios en ciertos fragmentos del genoma, por ejemplo, en microsatélites y genes separados durante el proceso maligno (Sanchez-Cespedes M., y otros, Ann Oncol, 1998, volumen 9(1), págs. 113-116; Sozzi G., y otros, Clin Can Res, 1999, volumen 5(10), págs. 2689-2692; Chen X.Q., y otros, Nat Med, 1996, volumen 2(9), págs. 1033-1035).

65 De este modo, en la fuente de datos disponibles, no existe conocimiento del repertorio genético de ADN extracelular de la sangre de pacientes con cáncer, la función biológica del ADN extracelular de la sangre en la oncopatología y los potenciales efectos terapéuticos de la destrucción o desactivación para el tratamiento de estas enfermedades y, según lo dicho anteriormente, la presente invención cumple con los requisitos del criterio de "novedad" (N).

5 Tal como estableció el solicitante, el ADN extracelular de la sangre de pacientes con cáncer contiene el repertorio único cuantitativo y cualitativo de genes y elementos genéticos reguladores que se diferencian ampliamente del repertorio de ADN que se describe en el genoma humano. A diferencia del ADN intracelular, el ADN extracelular de pacientes con cáncer contiene principalmente genes humanos únicos, que incluyen genes que están implicados en el desarrollo y mantenimiento del comportamiento maligno de las células cancerosas.

Se muestra que el ADN extracelular de la sangre de pacientes con cáncer contribuye al crecimiento maligno.

10 La destrucción, modificación y unión del ADN extracelular de la sangre ralentiza el crecimiento maligno. Dicha intervención es muy útil como terapia independiente y también incrementa la eficacia de métodos de tratamiento tradicionales.

15 Las nuevas características de la presente invención mencionadas anteriormente se basan en nuevas ideas sobre los mecanismos de las enfermedades oncológicas. De este modo, el presente método cumple con los requisitos del criterio de "actividad inventiva" (AI).

Breve descripción de los dibujos

20 Tal como se establece a continuación, la presente invención se ha explicado mediante la descripción detallada de realizaciones sin hacer referencia a los dibujos.

Realización preferente

25 El método de la invención se lleva a cabo de la siguiente manera:

Materiales y métodos.

30 Se utilizaron los siguientes agentes que destruyen el ADN extracelular de la sangre: ADNasa pancreática bovina (Sigma and Samson Med), ADNasa 1 humana recombinante (Dornasa alfa; Genetech), nucleasa extracelular de *Serratia Mercenses*. Las soluciones de ADNasa para la administración se produjeron mediante la disolución de soluciones madre de ADNasa en tampón fosfato estéril justo antes de la administración.

35 El ADN extracelular del plasma sanguíneo se aisló de la siguiente manera: se centrifugó plasma fresco (no más de 3-4 horas después de tomar las muestras) en Ficoll-PlaquePlus (Amersham-Pharmacia) durante 20 minutos a 1500 g a temperatura ambiente. Se separó la mitad del plasma, sin afectar el resto de células en el colchón de Ficoll, y se centrifugó adicionalmente a 10000 g durante 30 minutos para la separación de los fragmentos y el residuo celulares. Se separó el sobrenadante, sin afectar al sedimento, y se rellenó hasta el 1% de sarkosil, Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, EDTA 20 mM, NaCl 400 mM, y a continuación, se mezcló con un volumen igual de mezcla de fenol-cloroformo (1:1).
40 La emulsión preparada se incubó durante 2 horas a T = 65°C, a continuación, se separó la mezcla de fenol y cloroformo mediante centrifugación (500 g durante 20 minutos a temperatura ambiente).

45 El procedimiento de desproteización con la mezcla de fenol y cloroformo se repitió 3 veces y, a continuación, se procesó la fase acuosa con cloroformo y dietil éter. La separación de los disolventes orgánicos se realizó mediante centrifugación a 5000 g durante 15 minutos. A continuación, se añadió un volumen igual de isopropanol a la fase acuosa resultante y la mezcla se incubó durante toda la noche a 0°C. Después de la sedimentación, se separaron los ácidos nucleicos mediante centrifugación a 10000 g durante 30 minutos. El sedimento de los ácidos nucleicos se disolvió en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,6 con EDTA 5 mM y se sometió a un gradiente de CsCl (1 M, 2,5 M, 5,7 M) en un tubo de ensayo para el rotor SW60Ti. El volumen de la solución de ADN fue de 2 ml, el volumen de cada etapa de CsCl fue de 1 ml. La ultracentrifugación se realizó en una centrifugadora L80-80 (Beckman) durante 3
50 horas a 250000 g. Se recogió el ADN de la superficie de cada etapa de gradiente en fracciones. Estas fracciones se dializaron durante 12 horas (T = 4°C). Se determinó la presencia de ADN en las fracciones mediante electroforesis en agar y el ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. La cantidad de ADN se determinó con un espectrofotómetro (Beckman DU70) en una cubeta (100 ml) a una longitud de onda de 220-230 nm.

55 En los experimentos se utilizaron ratones con carcinoma de pulmón de Lewis y carcinoma de Erlich. Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 con suero de ternero al 10% y penicilina-estreptomocina al 1% en una atmósfera de CO₂ al 5%.

60 Para la inoculación de tumores en ratones, las células se cultivaron hasta que se formó una monocapa, a continuación se separaron con tampón de tripsina-EDTA. Las células se lavaron 3 veces mediante centrifugación en tampón fosfato y, a continuación, se resuspendieron hasta una concentración de $0,5 \cdot 10^7$ /ml en el mismo tampón. La viabilidad celular se determinó con tinción con azul de metileno en un hemocitómetro. Para el trasplante se utilizaron suspensiones celulares con no menos del 95% de células vivas.

65 Se utilizaron ratones C57B1 y ratones blancos criados de manera aleatoria del criadero "Rapolovo". El peso de los

animales fue de 24-26 g. Se mantuvieron 6-7 animales en una jaula con una dieta estándar sin limitación de agua. Se transplantaron células LLC en una dosis de 5×10^5 por ratón en 0,1 ml de tampón fosfato en tejidos blandos del muslo. Se transplantaron tumores de Erlich mediante la administración de 0,2 ml de una suspensión celular al 10% en solución fisiológica.

5 En algunos experimentos, se cuantificó el nivel de ADN extracelular en plasma sanguíneo. Se aisló el ADN según el protocolo mencionado anteriormente. Se midió el nivel de ADN con el kit PicoGreen. Se realizó una electroforesis del ADN extracelular de la sangre con gel de agar al 1%. Se visualizó el ADN con una solución de bromuro de etidio. Mediante densitometría se determinaron los niveles de la fracción de ADN de peso molecular elevado (más de 300 pares de bases). Como marcador de la electroforesis se utilizó el ADN del fago lambda digerido con EcoRI y HindIII.

Ejemplo 1. Inhibición del crecimiento del carcinoma de Erlich.

Se utilizó ADNasa I humana recombinante (Genentech).

15 Grupo 1: Como control se utilizaron 10 ratones que portaban el carcinoma de Erlich. Se inyectaron los ratones por vía intraperitoneal con 0,2 ml de tampón fosfato dos veces al día cada día desde el día 3 hasta el día 7 después del trasplante de células tumorales.

20 Grupo 2: Se administraron 10 ratones que portaban el carcinoma de Erlich con inyecciones intraperitoneales de ADNasa en una dosis de 1 mg/kg de peso corporal en 0,2 ml de tampón fosfato cuatro veces al día cada día desde el día 3 hasta el día 7 después del trasplante de células tumorales.

25 Grupo 3: Se administraron 10 ratones que portaban el carcinoma de Erlich con inyecciones intraperitoneales de ADNasa en una dosis de 0,5 mg/kg de peso corporal en 0,2 ml de tampón fosfato cuatro veces al día cada día desde el día 3 hasta el día 7 después del trasplante de células tumorales.

Grupo 4: Se administraron 10 ratones que portaban el carcinoma de Erlich con inyecciones intraperitoneales de ADNasa en una dosis de 0,1 mg/kg de peso corporal en 0,2 ml de tampón fosfato cuatro veces al día cada día desde el día 3 hasta el día 7 después del trasplante de células tumorales.

30 Grupo 5: Se administraron 10 ratones que portaban el carcinoma de Erlich con inyecciones intraperitoneales de ADNasa en una dosis de 0,05 mg/kg de peso corporal en 0,2 ml de tampón fosfato cuatro veces al día cada día desde el día 3 hasta el día 7 después del trasplante de células tumorales. Los resultados se evaluaron como el Índice de Inhibición del Crecimiento (GII, por sus siglas en inglés) del tumor (%) en el último día de las inyecciones de ADNasa. También se realizaron la cuantificación del ADN extracelular del plasma sanguíneo y su calificación electroforética.

35 Los resultados se presentan en la tabla 1.

Tamaño del tumor, nivel de ADN extracelular y perfil de la electroforesis del ADN extracelular en el día 7 después del trasplante del tumor.

40 Tabla 1

Grupo	Volumen del tumor	Inhibición (%)	Nivel de ADN extracelular, (ng/ml)	Presencia de fracciones de peso molecular elevado de ADN extracelular
Control	98 +/- 14	-	104,8	100%*
1 mg/kg	23 +/- 6	76%	38,3	0
0,5 mg/kg	32 +/- 6	67%	55,1	25%
0,1 mg/kg	58 +/- 12	37%	78,0	70%
0,05 mg/kg	87 +/- 11	10%	98,7	100%

* La densidad electroforética del grupo de control se consideró como el 100%.

Los datos presentados demostraron que son necesarias dosis suficientemente elevadas de ADNasa 1 para conseguir el mejor efecto terapéutico.

45 Ejemplo 2. Inhibición del crecimiento del carcinoma de Erlich.

Se utilizó ADNasa I humana recombinante (Genentech).

50 Se utilizaron 5 grupos de ratones que portaban LLC.

Grupo 1 -7 ratones – el control.

Grupo 2 – se administraron 6 ratones con inyecciones intraperitoneales de ADNasa en dosis de 1 mg/kg de peso corporal dos veces al día cada día desde el día 3 hasta el día 5 después del trasplante de células tumorales.

55 Grupo 3 – se administraron 6 ratones con inyecciones intraperitoneales de ADNasa en dosis de 1 mg/kg de peso corporal dos veces al día cada día desde el día 3 hasta el día 10 después del trasplante de células

tumorales.

Grupo 4 – se administraron 6 ratones con inyecciones intraperitoneales de ADNasa en dosis de 1 mg/kg de peso corporal dos veces al día cada día desde el día 3 hasta el día 15 después del trasplante de células tumorales.

5 Grupo 5 - se administraron 6 ratones con inyecciones intraperitoneales de ADNasa en dosis de 1 mg/kg de peso corporal dos veces al día cada día desde el día 3 hasta el día 18 después del trasplante de células tumorales.

10 Grupo 6 – se administraron 6 ratones con inyecciones intraperitoneales de ADNasa en dosis de 1 mg/kg de peso corporal dos veces al día cada día en los días 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17 después del trasplante de células tumorales.

15 Grupo 7 – se administraron 6 ratones con inyecciones intraperitoneales de ADNasa en dosis de 0,5 mg/kg de peso corporal cuatro veces al día cada día desde el día 3 hasta el día 10 después del trasplante de células tumorales. Los resultados se evalúan como la supervivencia de animales en el día 30 y el día 50 después del trasplante de células tumorales. Los resultados se presentan en la tabla 2.

Supervivencia de los animales en el día 30 y el día 50 después del trasplante de células tumorales.

Tabla 2

Grupo	día 30 (número de animales vivos/muertos en el grupo)	día 50 (número de animales vivos/muertos en el grupo)
1	0-7	0-7
2	0-6	0-6
3	3-3	0-6
4	5-1	3-3
5	6-0	6-0
6	0-6	0-6
7	4-2	1-5

20 Los datos presentados demostraron que se incrementa la eficacia de la terapia a medida que se alarga el tiempo de tratamiento. La eficacia de la terapia disminuye si no es ininterrumpido. Es preferente la administración de dosis múltiples.

25 Ejemplo 3. Tratamiento del carcinoma de pulmón.

Se admitió en el hospital un hombre de 54 años de edad con diagnóstico de carcinoma de pulmón.

30 Mediante el consentimiento del paciente, debido a la falta de cualquier modalidad de tratamiento disponible, se prescribieron inyecciones subcutáneas de dornasa alfa. El tratamiento se inició con la administración de una dosis diaria de 50 mkg/kg. Cada día se midió el nivel de ADN extracelular de la sangre y se fraccionó el ADN extracelular de la sangre mediante electroforesis. Una vez a la semana se comprobaron el sitio de tumor primario y la metástasis con rayos X y tomografía por RMN. Después de un periodo inicial de 7 días, la dosis diaria de dornasa alfa se incrementó hasta 100 mkg/kg debido a que no hubo cambios en el nivel y el patrón de electroforesis del ADN

35 extracelular de la sangre y no hubo reacciones del sitio primario del tumor ni metástasis. Debido a que no hubo cambios después de otros 7 días, se incrementó la dosificación hasta 150 mkg/kg. Dos días después de la primera inyección de la preparación en una dosis de 150 mkg/kg, se observó la retracción del material (en más del 50%) de la fracción de ADN extracelular de la sangre con un tamaño superior a 300 pares de bases, aunque la cantidad total de ADN extracelular no disminuyó de manera importante (menos del 20%). Durante los siguientes 4 días, la

40 condición general del paciente mejoró de manera destacable y en el día 7 de este ciclo de terapia se observó el 25% de disminución del tamaño de la lesión del tumor primario y signos de regresión de dos metástasis de hueso mediante rastreo con RMN y examen por rayos X. Las muestras de ADN extracelular del paciente tomadas antes del inicio del tratamiento y 21 días después del inicio de la terapia se clonaron mediante un método que permitía la construcción de bibliotecas de plásmidos no amplificadas de ADN extracelular con una representatividad de hasta un

45 millón de clones con un tamaño promedio de 300-500 pares de bases. El ADN que se aisló con el protocolo mencionado anteriormente se desproteinizó adicionalmente con proteinasa K (Sigma) a T = 65°C para eliminar las proteínas unidas de manera fuerte. Después de la desproteínización y el tratamiento de una etapa de la mezcla de fenol y cloroformo (T = 65°C), se precipitó el ADN durante toda la noche con 2,5 volúmenes de etanol. A continuación, el ADN se trató con restrictasa EcoRI durante 3 horas o con polimerasa Pfu (Stratagene) en presencia

50 de 300 mM de todos los desoxinucleotidtrifosfatos para la eliminación de los extremos cohesivos. El ADN completado se fosforiló mediante la T4 polinucleotidoquinasa (30 U, 2 horas). Las preparaciones se ligaron al plásmido pBluescript (Stratagene), el cual se había digerido con EcoRI o PvuII y desfosforilado mediante la fosfatasa CIP (Fermentas) durante 1 hora. Se utilizaron 1 mkg de vector y 0,1-0,5 mkg de ADN de suero. El proceso de ligación se realizó con el kit Rapid Legation (Roche) durante 10 horas a T = 16°C. El volumen de esta mezcla fue de

55 50 ml. La biblioteca ligada se transformó en células DH12S (Life Technologies) mediante un electroporador porador de E. Coli (BioRad). Se utilizaron 12-20 cubetas de electroporación para la transformación de una biblioteca. Se

clonaron las diluciones en serie de la biblioteca de 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} en agar al 1,5% y medio LB complementado con 100 mg/ml de ampicilina. En ambos casos, las bibliotecas representaban $2-3 \cdot 10^6$ clones.

- 5 El análisis de 96 clones seleccionados de manera aleatoria con un tamaño de 300-1000 pares de bases de la biblioteca de “antes del tratamiento” mostró que 55 de 96 clones eran las secuencias únicas de ADN humano. Para 15 secuencias de las 55, se identificaron la función del gen o el correspondiente producto génico con el Banco de genes humano.

Gen o el correspondiente producto proteico	Función descrita en la cancerogénesis y la progresión del cáncer.
Proteína receptora acoplada a proteína G	Función clave en la transformación neoplásica, inhibición de la apoptosis, independencia de las hormonas y metástasis.
Activador CBP acoplado a Snf2 (SCARP)	Activador de la transcripción, descrito en el sarcoma sinovial y la leucemia.
Gen que contiene la caja SRY	Modulador de la transcripción expresado en la embriogénesis. Descrito en meduloblastoma, tumores en las gónadas, melanoma muy metastásico.
Tirosina quinasa	Función clave en la red de regulación de células cancerosas. Algunos homólogos de clase son los productos de oncogenes celulares.
Proteína de activación de fibroblastos, proteasa de la superficie celular	Implicada en la invasión y metástasis del cáncer.
Testican de cerebro	Descrito en rhabdomiosarcoma embrionario.
Dominio KRAB, proteína con dedo de Zn	Descrito en la embriogénesis temprana, neuroblastoma, sarcoma de Ewing, linfoma de células T, relacionado a la adquisición de la resistencia a fármacos en el cáncer de pulmón.
Antígeno asociado a melanoma	Antígeno expresado en células de melanoma.
N-cadherina	Implicada en la invasión y la metástasis del cáncer.
Interleuquina 7	Factor de crecimiento autocrino-paracrino esencial propuesto para muchos cánceres.
Proteína de tipo helicasa de ARN con caja DEAD	Expresada en células muy proliferantes y en células cancerosas.
Lipina-1	Implicada en la respuesta de células cancerosas a fármacos citotóxicos.
Dineína	Participa en el tráfico intracelular de p53, descrita en el cáncer de próstata y el carcinoma hepatocelular.
Proteína Ramp	Descrita en carcinoma embrionario humano

- 10 El análisis de 100 clones seleccionados de manera aleatoria de la biblioteca de “21 días después del tratamiento” mostró que más del 90% de las secuencias de clones representaban fragmentos cortos de ADN repetitivo de genoma humano con dominancia de ADN alfa satélite.

- 15 Por lo tanto, la utilización de ADNasa en dosis que son suficientes para destruir el ADN extracelular de la sangre con un tamaño superior a 300 pares de bases conduce a la desaparición de fragmentos únicos de genoma humano del ADN extracelular de la sangre, que incluyen los implicados en el desarrollo y mantenimiento del comportamiento maligno de células cancerosas. Al mismo tiempo, el tumor responde a la terapia aplicada.

20 Aplicación industrial

Para la realización de los métodos, se utilizaron materiales conocidos y equipos fabricados en condiciones de planta y, según lo mencionado anteriormente, la presente invención cumple con los requisitos del criterio de “aplicación industrial” (AI).

25

REIVINDICACIONES

1. ADNasa I humana recombinante para utilizar en el tratamiento de un paciente que tiene cáncer, en la que dicha ADNasa se administra por vía parenteral a la circulación sanguínea sistémica de manera diaria a 0,15-500 mg/kg durante un periodo de 5-360 días.
- 5