

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 623**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2010 E 10730456 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 2452189**

54 Título: **Proceso para la identificación de compuestos para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

04.07.2009 ES 200930417

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

12.02.2014

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN CENTRO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS CARLOS III
(100.0%)
C/ Melchor Fernández Almagro 3
28029 Madrid, ES**

72 Inventor/es:

**SOENGAS GONZÁLEZ, MARÍA SOLEDAD y
TORMO CARULLA, DAMIÀ**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 442 623 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

Proceso para la identificación de compuestos para el tratamiento del cáncer

5 **CAMPO TÉCNICO**

La presente invención se refiere al campo de la oncología y se centra principalmente en identificar compuestos que pueden usarse para tratar diferentes tipos de cáncer, por ejemplo: melanoma, páncreas, colon, vejiga, glioma, mama, próstata, pulmón y carcinoma de ovario.

10

Además, la presente invención también abarca los compuestos identificados por un proceso tal, por ejemplo el compuesto BO-110 (véase posteriormente), que es capaz de promover una muerte celular de tumor claro en todos los tipos de cáncer anteriormente indicados.

15 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

El melanoma sigue siendo un prototipo de cánceres sólidos con incidencia creciente y pronóstico extremadamente negativo en etapas avanzadas (Jemal *et al.*, 2008). Se ha empleado considerable esfuerzo para la identificación de determinantes moleculares que subyacen en la quimio e inmunorresistencia de melanoma. Los únicos agentes aprobados por la Agencia de Fármacos y Alimentos de los EE.UU. (FDA) para el tratamiento del melanoma metastásico son el agente alquilante dacarbazina (DTIC) y el inmunomodulador IL-2 (Tawbi y Kirkwood, 2007). Sin embargo, rara vez más del 5 % de los pacientes se benefician de respuestas completas y duraderas en melanoma metastásico, y las toxicidades secundarias pueden ser graves. En consecuencia, la supervivencia media actual de los pacientes con melanoma metastásico es de 6 a 10 meses y, por ello, el desarrollo de terapias mejoradas es una prioridad en esta enfermedad (Jemal *et al.* 2007).

20

25

Inicialmente, se pensó que el análogo sintético de ARNbc viral llamado pIC (ácido poliinosin-policitidílico), un compuesto que se ha utilizado durante más de cuatro décadas para estimular el sistema inmune de manera dependiente de IFN (Field *et al.* 1967), era un agente terapéutico prometedor contra el melanoma. Desgraciadamente, los estudios clínicos con pIC desnudo revelaron su baja estabilidad, baja inducción de IFN y ausencia de efecto antitumoral para melanoma (Robinson *et al.*, 1976). Por lo tanto, se considera que el pIC como agente sencillo es un pobre agente antimelanoma.

30

Los análisis histogenéticos de alto rendimiento y los estudios sistemáticos funcionales han supuesto avances significativos en nuestra comprensión del inicio y progresión del melanoma, y los complejos mecanismos asociados con el fracaso de los tratamientos (Fecher *et al.*, 2007; Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Se están identificando defectos consistentes y alteraciones en las cascadas de señalización de BRAF/MAPK, PI3K/AKT, NF- κ B o NOTCH, proporcionando una plataforma excitante para el diseño racional de fármacos (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Sin embargo, la terapia dirigida no ha demostrado ser eficaz en ensayos sobre melanoma (Flaherty, 2006). Los programas de muerte celular controlados por mitocondrias y/o el retículo endoplásmico están también en evaluación, aunque demuestran ser invariablemente ineficaces *in vivo* (Hersey y Zhang, 2008). En consecuencia, o bien los fármacos antineoplásicos actuales no alcanzan su diana o sus dianas de manera eficaz, o tienen que administrarse en regímenes de dosificación que dan lugar a niveles de toxicidad inaceptables para los compartimentos celulares normales (Tawbi y Kirkwood, 2007). Es importante mencionar que durante el tratamiento pueden activarse mecanismos compensatorios, que seleccionan poblaciones de células con una quimiorresistencia aun mayor (Lev *et al.*, 2004; Shatton *et al.*, 2008; Wolter *et al.*, 2007).

35

40

45

De hecho, se considera que el melanoma presenta una capacidad notoria para eludir la apoptosis a través de distintas rutas, lo que le confiere al melanoma la capacidad de progresar, formar metástasis y sobrevivir a tratamiento con diferentes terapias (revisado por Ivanov *et al.*, 2003).

50

A diferencia de la quimioterapia convencional, cuyo objetivo es matar células tumorales principalmente desde "dentro" (es decir, activando programas intrínsecos de muerte celular), la inmunoterapia tradicionalmente, ha implicado una cascada indirecta de interacciones célula-célula. En el melanoma, la mayor parte de los esfuerzos se han centrado en incrementar los niveles o la eficacia funcional de dos compartimentos: las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T citotóxicos (Wilcox y Markovic, 2007). También se están ensayando vacunas, así como anticuerpos dirigidos contra inmunomoduladores inhibidores (p. ej. CTL4), aunque con resultados frustrantes en los ensayos clínicos en fase IV (Kirkwood *et al.*, 2008). Más recientemente, se está persiguiendo la estimulación del sistema inmune innato mediante la activación de receptores de tipo Toll (TLR)-3, -4, -7 y -9, para apoyar la destrucción citotóxica de las células de melanoma mediante linfocitos citolíticos naturales (NK), células dendríticas (DC) y linfocitos T (para revisiones recientes, véanse Kirkwood *et al.*, 2008, o Tormo *et al.* 2007). Sin embargo, múltiples estudios, incluyendo de los inventores, han demostrado una capacidad inherente de las células para eludir las terapias inmunológicas regulando negativamente (editando) marcadores inmunorreactivos de superficie. Los melanomas también pueden ejercer efectos supresores sobre el hospedador (p. ej., inhibición de la maduración de las células presentadoras de antígenos o bloqueo de la activación completa de linfocitos T) (Tormo *et al.*, 2006; Ilkovitch y Lopez, 2008; Verma *et al.*, 2008). Por lo tanto, los melanomas presentan una capacidad inherente para eludir la actividad antitumoral de los inmunomoduladores.

55

60

65

En el campo de la inmunoterapia, una de las moléculas cuyo aumento de expresión se ha estudiado como un potencial factor positivo en la terapia de melanoma es MDA-5 (gen asociado a la diferenciación de melanoma 5), un producto inicialmente descrito como un gen asociado con la diferenciación del melanoma (Kang *et al.*, 2002). MDA-5 es una helicasa que reconoce y se activa por ARN bicatenario (ARNbc) largo (Yoneyama *et al.*, 2005). Otras helicasas de ARN son RIG-I (proteína inducible por ácido retinoico 1, también llamada Ddx58), que reconoce 3 fosfatos desnudos de ARNbc corto y LGP2 (también llamada Ddx58), que es un regulador negativo en la detección de ARNbc.

Siempre que puedan generarse ARNbc largos por y durante infecciones virales, MDA-5 actúa como una primera línea de inmunidad innata frente a patógenos virales (Akira *et al.*, 2006). Además, MDA-5 tiene dominios de reclutamiento de activación de caspasas (CARD). Juntos la helicasa y los dominios CARD activan NF- κ B y otros factores de transcripción implicados en la regulación de citocinas (Kawai *et al.*, 2005). Por lo tanto, la función mejor conocida de MDA-5 es la estimulación inmune.

Desde una perspectiva terapéutica, se sabe que tanto IFN- β como ARNbc inducen la transcripción del gen Mda-5. Por lo tanto se ha propuesto que ARNbc tiene un papel en el aumento de la expresión de Mda-5 en la inhibición del crecimiento inducido por IFN. Además se ha mostrado (Kang *et al.*, 2002) que la inducción del MDA-5 endógeno mediante IFN- β es citostática (en otras palabras, detiene el ciclo celular). Por lo tanto, para activar muerte celular tumoral, MDA-5 tuvo que sobreexpresarse ectópicamente a niveles elevados (Kovacs *et al.*, 2002). Además, esta actividad pro-apoptótica de la expresión ectópica de MDA-5 no es eficaz en células tumorales con una ruta RAS/MEK/ERK hiperactiva (Lin *et al.*, 2006), como es el caso de los melanomas (Chin *et al.*, 2006). Por lo tanto una cuestión pendiente en el campo era como activar la MDA-5 endógena con los agentes quimioterapéuticos de una manera exclusiva para el compartimento del tumor (sin inducir toxicidades secundarias en células normales).

La solicitud de patente de Estados Unidos US 2007/0259372 propone la identificación de agonistas o antagonistas del IFN- β , IFN- α o IFN- γ por compuestos capaces de potenciar la expresión de MDA-5. La patente sugiere también que los inductores de la expresión del gen Mda-5 (por medio de su promotor) pueden considerarse compuestos candidatos para inducir la diferenciación terminal de células tumorales. También sugiere un posible papel de MDA-5 en la generación de señales apoptóticas a través de su dominio CARD. Sin embargo, hasta el momento, no se conocía cuáles eran las dianas de MDA-5 capaces de desencadenar apoptosis, y cómo activarlas de manera trazable y selectiva para las células tumorales. Además, como las células de melanoma tienen una ruta activa de RAS/MEK/ERK (que inhibe MDA-5), así como una notable capacidad para eludir la muerte celular apoptótica no fue obvio que las señales apoptóticas mediadas por MDA-5 fueran un mecanismo válido para la terapia contra el melanoma. Por lo tanto, a partir de la información anterior sobre la regulación y función de MDA-5 no parecía que esta proteína fuera una fuerte diana para procedimientos para identificar candidatos a agentes terapéuticos contra el melanoma.

La autofagia está emergiendo como una estrategia alternativa para provocar el funcionamiento de la maquinaria endógena de las células cancerígenas.

Este proceso implica una intrincada cascada de acontecimientos que conduce, en último lugar, al secuestro de componentes citosólicos para la posterior degradación por los lisosomas (Xie y Klionsky, 2007). Dependiendo del mecanismo de englobamiento y la naturaleza de la carga suministrada a los autolisosomas, se han descrito múltiples mecanismos de autofagia. En el contexto de tratamiento antineoplásico, la macroautofagia, o degradación en masa de orgánulos celulares y agregados proteicos, está despertando interés por su potencial para comprometer la viabilidad celular por disfunción o agotamiento de orgánulos clave (p. ej., retículo endoplásmico o mitocondrias) (Hoyer-Hansen, 2008).

Sin embargo, se desconoce cómo está regulada la autofagia y su potencial terapéutico no es claro y sencillo (Hippert *et al.*, 2006). Por una parte, la macroautofagia (a la que se hará referencia simplemente como "autofagia" en lo sucesivo) ha demostrado potencial significativo para proteger células frente a una amplia diversidad de señales agresivas intracelulares y extracelulares, incluyendo fármacos antineoplásicos. Por esta actividad, la autofagia puede promover desarrollo de tumores (Mizushima *et al.*, 2008; Kroemer y Levine, 2008).

Paradójicamente, la autofagia se ha asociado también con muerte celular (Kromer *et al.* 2009). Por lo tanto, la autofagia excesiva o persistente puede promover la muerte celular por agotamiento de orgánulos clave (es decir retículo endoplásmico o mitocondrias); redirección de señales de supervivencia, desregulación de enzimas lisosomales y/o activación de programas apoptóticos dependientes de caspasa (Xie y Klionsky, 2007).

En consecuencia, no estuvo claro si la autofagia exacerbaría la quimio e inmunorresistencia del melanoma, en lugar de mejorar la respuesta al tratamiento. Además ninguno de los más de 20 genes de autofagia descritos hasta la fecha en células de mamífero se ha caracterizado con detalle en melanoma. Por lo tanto, se desconoce si la autofagia está regulada en el melanoma de una manera diferente a las células normales, para proporcionar una ventana para la intervención terapéutica. Una situación similar se aplica a cánceres agresivos tales como los que afectan a páncreas, vejiga, próstata y cerebro.

La solicitud de patente internacional WO2006/001956 divulga métodos para evaluar la capacidad de una molécula de ensayo para inducir NOXA en una célula cancerígena, comprendiendo, contactar la célula con la molécula de ensayo y determinar si la célula presenta e incrementa su expresión de NOXA, respecto al control.

5 La solicitud de patente internacional WO2004/045491 divulga un compuesto que comprende un polinucleótido (PEI) y un RNAbc (pIC) con un rango de 10-3000 ribonucleótidos, en el que el RNAbc (pIC) que se ha usado para la realización de todos los ejemplos contiene de 100-300 ribonucleótidos de longitud (obtenido de Pharmacia-Amersham).

10 En esta situación, sigue pendiente la identificación de agentes terapéuticos para el tratamiento de cáncer, alternativos a los ya autorizados y, especialmente, que sean válidos para el tratamiento de pacientes inmunocomprometidos. También sigue siendo necesario identificar posibles nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de procedimientos de identificación de candidatos a agentes terapéuticos para el tratamiento de cáncer entre los compuestos capaces de actuar sobre estas dianas.

15 Por lo tanto, la presente invención presenta una solución a ambos problemas.

Descripción de la invención

20 Como se ha indicado anteriormente, la presente invención se centra en primer lugar en la identificación de dianas terapéuticas, marcadores o parámetros, que establecen la base del desarrollo de un proceso útil para la identificación de compuestos (entre los capaces de actuar en estas dianas terapéuticas, marcadores o parámetros) capaces de tratar el cáncer.

25 Uno de los marcadores identificados en la presente invención, útil para la identificación de compuestos capaces de tratar cáncer, es el nivel de activación de la MDA-5 de la familia de helicasa. Este parámetro puede determinarse comprobando la existencia de escisión proteolítica de la proteína que da como resultado la separación de los dominios helicasa y caspasa: el compuesto candidato, para ser una agente terapéutico para el tratamiento de cáncer debería dar como resultado la escisión proteolítica, que es un indicio de que puede conducir a la activación de mecanismos de autofagia y apoptosis que darían como resultado la muerte de células cancerosas. Una posible metodología para este ensayo son inmunotransferencias (transferencia de Western) de extractos de proteína de cultivo celular y ensayos de las bandas de señal correspondientes a la proteína completa y fragmentos correspondientes a los dominios helicasa y dominios caspasa. Específicamente como se muestra en el Ejemplo 3, la aparición de una banda de 30 kD es indicativa de la existencia de escisión proteolítica. Como alternativa, también podría determinarse la activación de otra familia de helicasas de MDA-5, tal como RIG-I o LGP2.

35 Otro marcador identificado en la presente invención, también útil para la identificación de compuestos capaces de tratar el cáncer, es el nivel de expresión de NOXA. El fundamento detrás de esto es un aumento en los niveles de expresión de los genes correspondientes cuando se activan los mecanismos de autofagia y apoptosis. La determinación de los niveles de expresión de estas proteínas puede realizarse, por ejemplo, determinando la concentración del ARN mensajero correspondiente (esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante Transferencia de Northern o RT-PCR), o la concentración de la proteína en sí misma en un extracto proteico del cultivo celular correspondiente (por ejemplo, mediante una transferencia de tipo Transferencia de Western). Además, puede detectarse NOXA *in situ* (muestras de ensayo tisulares), mediante inmunohistoquímica.

45 En una realización preferida de la presente invención, se examinan tanto MDA-5 como NOXA, como una corroboración de que los mecanismos de autofagia y apoptosis se activan, puesto que MDA-5 se considera un punto de unión entre ellos.

50 Adicionalmente, la invención puede incluir una etapa para determinar la inducción de autofagia por el compuesto candidato para su uso contra cáncer. La inducción de autofagia puede determinarse por varias técnicas, que comprenden:

- Controlar las modificaciones postraduccionales de la proteína expresada por el gen de autofagia 8 (que se denomina ATG8 o LC3). La proteína LC3 se procesa y lipida cuando se inserta en autofagosomas, que son estructuras membranosas en las que se secuestran componentes celulares durante la autofagia. Debido a que la conformación y movilidad electroforética de esta proteína se cambian por lipidación, una de las posibles técnicas para verificar la inducción de autofagia es el uso de técnicas de inmunotransferencia con anticuerpos dirigidos contra esta proteína. Esta técnica permite verificar que la banda correspondiente a la proteína, después de realizar la electroforesis, es diferente en muestras de control en comparación con las muestras en las que se supone que el compuesto ha inducido autofagia. Como alternativa, si el anticuerpo reconoce específicamente la forma de autofagosomas, la unión del anticuerpo confirmaría la inducción de autofagia en la muestra tratada con el compuesto candidato.

- Control de cambios en distribución intracelular de proteína LC3, puesto que otra característica de la autofagia es la relocalización de LC3 del citosol a los autofagosomas de nueva formación (Xie y Klionsky, 2007). Por lo

tanto la formación de focos proteicos puede considerarse indicativa de la formación de autofagosomas, especialmente en etapas tempranas. Esto puede detectarse controlando la LC3 endógena por inmunofluorescencia o inmunohistoquímica en células fijas o tejidos fijos. Como alternativa, la autofagia puede visualizarse en células vivas determinando la localización celular del derivado fluorescente de LC3. Es habitual usar como proteína fluorescente GFP (proteína verde fluorescente) o RFP (proteína roja fluorescente), que permiten seguir la autofagia por microscopía de fluorescencia: los cambios de la distribución de fluorescencia en la célula de un patrón difuso a una tinción focal son indicativos de la inducción de autofagia. En la presente invención, esta metodología implica el uso de células que se habían transfectado con un vector que permitía la expresión transitoria de la proteína de fusión (tal como un plásmido o virus recombinante) o células en las que el segmento de ADN, capaz de expresar la proteína de fusión formada por la proteína indicadora y LC3 se integraron en el genoma de una manera estable. Un ejemplo de esta estrategia se muestra en el Ejemplo 1 posterior, en el que las células se transfectaron previamente con un retrovirus recombinante. Esto dio como resultado la inserción, en el genoma celular, del fragmento de ADN que contiene las partes codificantes de la proteína GFP y LC3 juntas, de modo que conduciría a una proteína de fusión en el ADN del genoma celular. Por lo tanto, los ensayos de cambios de distribución intracelular con las células transfectadas estables podrían llevarse a cabo.

- Uso de microscopia electrónica de transmisión para detectar la entrada de un compuesto candidato en la célula. Esta situación dirige la formación de autofagosoma en las etapas más avanzadas del proceso de autofagia. La visualización de acumulación de estructuras densas (unidas a membrana) se considera una característica indicativa de la formación de autofagosoma. El proceso de autofagia puede confirmarse en etapas posteriores del proceso (es decir 24 ó 30 horas después del tratamiento con el compuesto a ensayar), en las que el microscopio electrónico debería mostrar la formación de grandes vacuolas fagocíticas, indicativas de colapso celular.

Teniendo en cuenta el análisis anterior, la primera realización de la presente invención se refiere a un proceso (en lo sucesivo en el presente documento el proceso de la invención), para la identificación de compuestos para su uso en el tratamiento del cáncer, que comprende las etapas de:

- poner en contacto el compuesto candidato con un cultivo de células cancerosas o línea celular cancerosa derivada de células cancerosas;
- determinar al menos uno de los siguientes parámetros:
 - el nivel de activación de una MDA-5 de la familia de las helicasas;
 - el nivel de expresión de NOXA;
 - o una combinación de ambos;
- comparar los datos obtenidos con los observados en un control de las mismas células tratadas de forma similar, aunque en ausencia del compuesto candidato;
- seleccionar los compuestos que han dado lugar a un aumento significativo en el parámetro o parámetros determinados en la etapa b) en comparación con el control.

Debería observarse que la diferencia entre los datos obtenidos del cultivo celular tratado con el compuesto candidato y el cultivo de control no tratado se considerará estadísticamente significativa cuando el análisis dé como resultado valores de $p < 0,05$.

En una realización preferida, el proceso de la invención también determina si el compuesto candidato induce autofagia en células cancerosas, en una línea celular derivada de células cancerosas o en un modelo de cáncer en ratón. Como se ha explicado anteriormente, la determinación de la inducción de autofagia puede realizarse comprobando el nivel de expresión, la presencia de modificaciones postraduccionales o la localización intracelular de una proteína de autofagia. Más específicamente la inducción de autofagia se determina por una técnica seleccionada de entre: cambio de movilidad de electroforética de la proteína LC3 o detección de formación de focos de proteína LC3. Como alternativa la inducción de autofagia se determina comprobando la presencia de autofagosomas por observación microscópica de los mismos, por ejemplo usando microscopia electrónica de transmisión.

En una realización preferida adicional, el proceso anteriormente descrito de la invención comprende tres etapas: determinación del nivel de activación de MDA-5, el nivel de expresión de NOXA y la inducción de autofagia.

El proceso de la invención puede usarse para la identificación de compuestos para su uso como agentes terapéuticos para tratar varios tipos de cáncer, por ejemplo: melanoma, páncreas, colon, vejiga, mama, próstata, pulmón y ovario.

Por lo tanto, si la presente invención se dirige a identificar compuestos para su uso como agentes terapéuticos para tratar melanoma, comprendería las siguientes etapas:

- Poner en contacto el compuesto candidato con un cultivo de células de melanoma o una línea celular derivada de células de melanoma;
- Determinar al menos uno de los siguientes parámetros:

- i. El nivel de activación de una MDA-5 de familia de las helicasas;
 - ii. El nivel de expresión de NOXA;
 - iii. O una combinación de ambos;
- 5 c) Comparar los datos obtenidos en la etapa b) con los observados en el control de las mismas células tratadas de forma similar, pero en ausencia del compuesto candidato;
- d) Seleccionar los compuestos que han dado lugar a un aumento significativo del parámetro o parámetros determinados en la etapa b) en comparación con el control.

10 Con respecto a líneas celulares válidas, puede usarse de cualquier línea celular de melanoma, preferiblemente de un origen humano. Son ejemplos de líneas celulares válidas, que se usan en los ejemplos de la invención, las líneas celulares humanas SK-Mel-19, SK-Mel-28, SK-Mel-103 y SK-Mel-147, y las células B16 murinas. Controles de células normales, melanocitos u otras células de la piel, así como células del sistema inmune, que habitualmente representan sitios de toxicidad secundaria en tratamiento del cáncer.

15 Como alternativa, el proceso de la invención puede centrarse en la identificación de compuestos para su uso como agentes terapéuticos para tratar al menos uno de los siguientes tipos de cáncer: carcinoma de páncreas, colon, vejiga, mama, próstata, pulmón y ovario. En este caso el proceso de la invención comprendería las siguientes etapas:

- a) Poner en contacto el compuesto candidato con un cultivo de células cancerosas de al menos uno de los tipos de cáncer anteriormente citados o una línea celular derivada de al menos uno de los tipos de cánceres anteriormente citados;
- b) Determinar al menos uno de los siguientes parámetros:
 - i. El nivel de activación de una MDA-5 de familia de las helicasas;
 - ii. El nivel de expresión de NOXA;
 - iii. O una combinación de ambos;
- c) Comparar los datos obtenidos en la etapa b) con los observados en el control de las mismas células tratadas de forma similar, pero en ausencia del compuesto candidato;
- d) Seleccionar los compuestos que han dado lugar a un aumento significativo del parámetro o parámetros determinados en la etapa b) en comparación con el control.

20 En este caso la línea celular se seleccionaría del grupo de líneas celulares de páncreas: IMIMPC2, MiaPaCa2, Aspc1, A6L, SKPC1 y Panc-1; o del grupo de líneas celulares de cáncer de colon: CACO, SW480 y SW1222; o del grupo de líneas celulares de cáncer de vejiga: RT112, MGHU4, 639V, 253J, MGHu3 y SW1170; o del grupo de líneas celulares de glioma: U87MG, U251 y T98G; o del grupo de líneas celulares de cáncer de mama: MDA231, MCF7 y T47D; o del grupo de líneas celulares de cáncer de próstata: LNCaP, PC3 y DU145; o del grupo de líneas celulares de cáncer de pulmón: H1299 y NCI H460; o del grupo de líneas celulares de cáncer de ovario: NCI H23, CHQK1 y SK-OV-3.

25 Un modo preferido de llevar a cabo el proceso de la invención se describe posteriormente en los ejemplos de la invención. En tal caso, el proceso de la invención se realiza usando una combinación de determinación de activación de MDA-5, análisis de expresión génica (observando aumentos de la expresión de NOXA) y confirmación de activación de autofagia por las tres posibles metodologías ya mencionadas: control de modificaciones postraduccionales de proteína LC3 por inmunotransferencia, seguimiento de cambios en la distribución celular de LC3 por detección de fluorescencia debido a la proteína fluorescente GFP (con células previamente transfectadas con un retrovirus recombinante que contiene una estructura capaz de expresar la proteína de fusión GFP-LC3), confirmación de formación de autofagosomas por microscopía electrónica de transmisión a las 5 horas de tratamiento con el compuesto candidato y confirmación de vacuolas fagocíticas a las 30 horas del tratamiento.

30 Debe observarse que el proceso anteriormente explicado de la invención permitió la identificación de un nuevo compuesto que comprende una combinación de ARN bicatenario (ARNbc), o un análogo del mismo, y un polication. En una realización preferida de la invención, dicho compuesto es BO-110 (pIC^{PEI}), que comprende una combinación de ácido poliinosin-policitídílico (pIC) y polietilenimina (PEI).

35 Como se demuestra posteriormente, en los ejemplos y figuras de la presente invención, BO-110 puede usarse eficazmente para tratar diferentes tipos de cáncer, por ejemplo: melanoma, carcinoma de páncreas, colon, vejiga, mama, próstata, pulmón y ovario.

40 Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende BO-110, para su uso en el tratamiento de cáncer, por ejemplo: melanoma, carcinoma de páncreas, colon, vejiga, mama, próstata, pulmón y ovario. Esta composición farmacéutica también es útil para tratar a pacientes inmunocomprometidos.

45 Sorprendentemente, la interacción funcional de pIC y PEI consigue un efecto técnico sinérgico, que mejora y modifica la suma de los efectos técnicos de las características individuales. Por lo tanto, BO-110 entra en las células y actúa de una manera diferente de sus componentes PEI y pIC. Específicamente, aunque PEI no tiene efecto celular medible y las señales de pIC aisladas inducen de forma transitoria inmunorrespuestas que en última instancia no tienen impacto biológico *in vivo*, BO-110 es capaz de matar selectivamente células tumorales. Por lo tanto, BO-110 ilustra el concepto

de letalidad sintética descrito para genes o compuestos, que como agentes sencillos no tienen actividad, pero que en combinación tienen un efecto neoplásico diferente y terapéuticamente explotable.

5 Por lo tanto, uno de los puntos más importantes de la presente invención es el descubrimiento inesperado de que el mimético de ARNbc viral ácido poliinosin-policitidílico (pIC) cambia su ruta de entrada y suministro a las células tumorales. Desde un reconocimiento convencional por el TLR-3 (receptor de tipo Toll 3), pIC puede dirigirse a una familia de sensores de ARNbc (diferentes de TLR3), cuando este ARNbc se combina con una familia de vehículos que permite específicamente el suministro citosólico. Esta actividad cambia el modo de acción de ARNbc de un inmunomodulador inconsecuente, a un agente de muerte masiva de células tumorales. Se demostró actividad antineoplásica con polietilenimina (PEI) así como lipofectamina, polifect o superfect. Aunque estos vehículos, por sí mismos, no eran biológicamente activos como agentes terapéuticos, la presente invención muestra que fueron capaces de proteger la molécula de pIC, manteniéndola en una forma estable que permite la activación de autofagia. Por lo tanto, la combinación de ARNbc/policación, ejemplificada por BO-110, representa una nueva entidad molecular con eficacia antineoplásica. Resulta más importante que el modo de acción de BO-110 no estaba anticipado. Este compuesto promueve una inducción dual de autofagia y apoptosis que conduce a una muerte coordinada y selectiva de células tumorales, particularmente pero no exclusivamente células de melanoma, sin afectar a la viabilidad de compartimentos normales. La maquinaria apoptótica se acopló mediante la proteína NOXA. Diferente a otros agentes quimioterapéuticos inductores de NOXA, BO-110 no requiere la proteína supresora de tumores p53. Esta es una ventaja importante puesto que p53 está mutada, deletionada o inactivada en una amplia mayoría de los cánceres humanos. El efecto es claramente superior a las respuestas clásicas a ARN viral desnudo, lo que explica los bajos resultados en los estudios clínicos de pIC desnudo para el tratamiento de melanoma.

25 Por lo tanto, BO-110, pero no ARNbc no en complejo, fue suficiente para promover el suicidio de células cancerosas y bloquear metástasis de cáncer *in vivo*, incluso en ratones inmunocomprometidos. Los análisis genéticos, funcionales y ultraestructurales descritos posteriormente en la presente invención demuestran que la inducción de autofagia no se desencadena por pIC para protección celular, sino para destruir selectivamente células tumorales. Demostrando adicionalmente estos resultados, aunque pIC se consideró como un inductor de inmunidad controlada por IFN, el efecto observado es independiente de la activación de la ruta de producción y secreción de IFN- α . De forma coherente con esta observación, la activación de la ruta autofágica se produce incluso en animales inmunocomprometidos. Tomados en su conjunto, estos datos demuestran que BO-110 se dirige a e identifica nuevos puntos de intervención para explotación clínica de programas de reconocimiento de patógenos intrínsecos, autofagia y muerte celular de tumores.

35 Los estudios genéticos y funcionales identificaron la MDA-5 endógena como el enlace entre la ruta autofágica y apoptótica dirigida por BO-110. Esto también es diferente de descripciones previas con respecto a MDA-5 que se restringieron a muerte celular apoptótica por componentes exógenos. La interacción entre MDA-5/NOXA también fue novedosa.

40 Por lo tanto, MDA-5 se presenta como una diana terapéutica adecuada para la exploración de agentes para el tratamiento de cáncer con la característica específica de desencadenar autodestrucción del tumor por proteasas apoptóticas intrínsecas y auto/lisosomales. Como se ha mencionado anteriormente, esta estrategia tiene ventajas frente a agentes terapéuticos convencionales que acoplan uno de estos mecanismos de forma independiente.

45 De forma similar, una entidad que ha permitido el descubrimiento de esta ruta debido a que es capaz de activarla, es el complejo BO-110 u otras combinaciones de un análogo del ARNbc y un vehículo catiónico. Estos agentes son por lo tanto, buenos candidatos para usarse para la fabricación de medicinas para el tratamiento del cáncer.

50 Como se utiliza en la invención, la expresión "fragmento largo de ARN bicatenario" se utiliza como contraposición a los fragmentos de ARN conocidos como ARN cortos o ARN de interferencia (ARNip). Por tanto, se considera que un ARN bicatenario (doble cadena) es "largo" si el fragmento de ARN bicatenario comprende al menos 25 nucleótidos por cadena. Se prefiere que el fragmento utilizado sea similar en longitud a los intermedios de ARN bicatenarios que aparecen en las células durante el ciclo celular de la mayoría de los virus de ARN que parecen ser el sustrato natural de la familia de helicasa de MDA-5, de modo que el ARN bicatenario de la invención se considera "largo" especialmente si comprende al menos 100 nucleótidos por cadena y, más particularmente, si comprende al menos 1000 nucleótidos por cadena.

55 Fragmentos de ARN bicatenario que se presentan en la naturaleza y podrían ser útiles para el uso de la invención podrían ser los intermedios de ARN bicatenario que aparecen durante el ciclo celular de Paramyxovirus (tales como el virus de la enfermedad de Newcastle, NDV, el virus Sendai (SDV)), Rhabdovirus (virus de la estomatitis vesicular (VSV)); flavivirus (virus de la hepatitis C (VHC)), ortomyxovirus (virus Influenza) y picornavirus (virus de la encéfalo-miocarditis (EMCV)).

60 En cuanto a los análogos de ARN bicatenario, además del ácido poliinosin-policitidílico (pIC), pueden ser útiles para la invención otros miméticos de ARNbc: a) aquellos cuyo esqueleto está formado por un compuesto similar a la ribosa, tales como los basados en LNA (ácido nucleico "bloqueado": resistente a hidrólisis), morfolino y PNA (ácido péptido nucleico); b) aquellos en los que al menos una de las bases nitrogenadas típicas de los nucleótidos del ARN se han

5 sustituido por análogos, que pueden conducir también a apareamientos diferentes de fenómenos naturales, tales como diaminopurina (que se empareja con el uracilo mediante tres enlaces de hidrógeno), el par xantina/diaminopirimidina (donde la forma ceto/ceto de la purina, la xantina, forma tres puentes de hidrógeno con la amina/amina pirimidina), o el par isoguanina/isocitosina (en el que la forma amina/ceto de la purina, la isoguanina, forma tres enlaces de hidrógeno con la pirimidin-ceto-amina, la isocitosina).

10 En cuanto al vehículo policationico, son adecuados para los fines del uso de la invención todos los capaces de alterar la permeabilidad de la membrana plasmática y/o inducir endocitosis, promoviendo la entrada en la célula del ARN bicatenario o su análogo y liberándolos al citosol, aumentando de este modo la activación de los sensores citosólicos de ARN bicatenario, tales como la helicasa MDA-5. Además de la polietilenimina (PEI) y lipofectamina, están abarcados en esta definición poli-L-lisina, polisilazano, polidihidroimidazoleno, polialilaminem y polietilenimina etoxilada (ePEI).

La invención se ilustra a continuación con más detalle mediante los Ejemplos y Figuras.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. La inducción de macroautofagia mediante BO-110 da como resultado la muerte celular del melanoma.

20 El panel A muestra la visualización por epifluorescencia de tinción focal de tipo autofagosoma de eGFP-LC3 en células de melanoma SK-Mel-103 tratadas durante 12 h con 1 μ g/ml de PEI en complejo con pIC (BO-110). Se muestran células tratadas con PEI como agente único como controles de referencia.

25 El panel B muestra una acumulación, dependiente del tiempo, de células SK-Mel-103 que muestran emisión de fluorescencia punteada de eGFP-LC3, tras el tratamiento con BO-110 o control de placebo. Se usó rapamicina como un inductor clásico de autofagia.

30 El panel C muestra inmunotransferencias de extractos celulares totales aislados de células SK-Mel-103 tratadas como se indica. Los tratamientos se indican sobre cada línea: Control (sin tratamiento: poblaciones de células incubadas sólo en presencia de vehículo), células tratadas con pIC o BO-110. A la izquierda de los paneles se indican las proteínas analizadas: ATG8 sin modificar (LC3 I), ATG8 lipídada (LC3 II) y control de carga (β -actina). En el lado derecho del panel el peso molecular, en kDa.

35 El panel D muestra microfotografías de microscopía electrónica de células SK-Mel-103 tratadas con BO-110 o control con PEI. Las flechas apuntan a autofagosomas y autolisosomas unidos a la membrana.

El panel E muestra microfotografías a alto (parte superior) y bajo (parte inferior) aumento de células SK-Mel-103 5 horas después de la incubación con vehículo (columna del lado izquierdo) o BO-110 (columna del lado derecho).

40 El panel F muestra microfotografías representativas de microscopía de campo claro (izquierda y centro) y microscopía electrónica (derecha) de colonias celulares después de 30 horas de tratamiento, como se indica en las fotografías.

Figura 2: Microscopía en intervalos de tiempo de la inducción de la autofagia mediante BO-110 en células de melanoma.

45 Se muestran microfotografías tomadas a los intervalos de tiempo indicados después del tratamiento con PEI (control) o BO-110 de células SK-Mel-103 que expresaban eGFP-LC3. Los agregados focales son indicativos de la formación de autofagosomas. Las flechas apuntan a las células que colapsan y se sueltan (células que mueren) durante el tratamiento.

50 Figura 3: El suministro al citosol de pIC debido a la presencia de PEI desencadena de forma selectiva la muerte de las células de melanoma.

55 El panel A muestra gráficos que representan el porcentaje de muerte celular, estimada mediante ensayo de exclusión de azul de tripano después de 24 y 48 h de tratamiento como se indica (NT: barras blancas, tratamiento con PEI: barras gris oscuro, tratamiento con pIC: barras gris claro, BO-110 barras negras). Los datos se representan como media \pm SEM de tres experimentos independientes con las diferentes líneas celulares indicadas sobre los gráficos. Como se muestra sólo las poblaciones de células de melanoma tratadas con BO-110 mueren eficazmente.

60 Panel B: microfotografías de microscopía electrónica de células SK-Mel-28 y SK-Mel-103 tratadas con vehículo (Ctr), PEI, pIC o BO-110, y visualizadas 12 h después del tratamiento. Para cada línea celular se muestran fotografías tomadas con dos aumentos diferentes. Las flechas apuntan a los autolisosomas, que se observan sólo en las células tratadas con BO-110.

Figura 4: Actividad citotóxica selectiva de BO-110 en células tumorales.

65

El panel A muestra imágenes representativas de campo claro de melanocitos aislados de prepucio humano (fila superior), células de melanoma humano SK-Mel-103 (fila intermedia) y línea de melanoma murino B16 (fila inferior) después del tratamiento con vehículo, PEI, pIC o BO-110, según se indica.

5 El panel B muestran las curvas de respuesta a dosis para los tratamientos de PEI y pIC, como agentes individuales o en combinación (BP-110) (grupo de barras situado del lado derecho en cada gráfico), de FM (melanocitos de prepucio) y SK-Mel-103. La respuesta se expresa como el porcentaje de células muertas 24 horas después del tratamiento.

10 El gráfico en el panel C representa el porcentaje de muerte celular, estimada mediante ensayos de exclusión de azul de tripano 24 h después de que se realizaran los tratamientos (Ctrl: sin tratamiento; PEI: polietilenimina; pIC y BO-110). Los datos se representan como media \pm SEM de tres experimentos independientes realizados con las líneas celulares indicadas (SK-Mel-103 o fibroblastos de prepucio). Como en el panel A, se muestra que sólo las poblaciones de células de melanoma tratadas con BO-110 mueren eficientemente.

15 **Figura 5. MDA-5 es un sensor y un controlador de la citotoxicidad de BO-110 en células de melanoma.**

20 El panel A muestra la inmunotransferencia de extractos de células totales de SK-Mel-28 (fotografía superior) y SK-Mel-147 (inferior) no tratadas (NT) o tratadas con PEI, pIC, BO-110 o bortezomib (Bor) según se indica en los diferentes carriles. El asterisco corresponde a una banda no específica. Las flechas indican la posición en la que debería observarse la banda de 30 kD indicativa de la escisión de MDA-5.

25 Panel B: procesamiento de MDA-5 en células SK-Mel-147 no infectadas o infectadas con lentivirus que expresan ARNph mezclado o de MDA-5 visualizado mediante inmunotransferencia de extractos celulares después del tratamiento con pIC, BO-110 o vehículo según se indica. Como se muestra en el panel A, los asteriscos corresponden a una banda no específica y las flechas indican la posición de la banda de 30 kDa indicativa de la escisión de MDA-5.

30 El panel C muestra el efecto inhibitorio del ARNph de MDA-5 sobre la toxicidad diana inducida por BO-110 evaluado mediante ensayos de exclusión de azul de tripano 24 horas después del tratamiento con pIC solamente (barras grises, ■), complejo BO-110 (barras negras, ■) o células no tratadas (barras sin relleno). Se muestran también los resultados de infección con el ARNph de control ("sh Control"). Los datos se representan como medias \pm SEM de tres experimentos independientes.

Figura 6: Efecto de los inhibidores farmacológicos de la autofagia sobre la actividad citotóxica de BO-110.

35 El panel A muestra el efecto de 3-metiladenina (3-MA) y cloroquina (Chlor) sobre la relocalización de EGFP-LC3 en los autofagosomas, evaluado a partir del porcentaje de células SK-Mel-103 que presentaban focos de fluorescencia debido a GFP-LC3 12 h después del tratamiento con BO-110 (barras con relleno negro) o con el tampón de control (barras sin relleno).

40 El panel B muestra el efecto inhibitorio de Cloroquina (Chlor), pepstatina A (PEP) o E64d sobre la muerte celular estimada mediante exclusión de azul de tripano 20 horas después del tratamiento con vehículo (barras blancas) o BO-110 (barras negras) Los datos se muestran como medias \pm SEM de tres experimentos independientes

45 El panel C muestra microfotografías de fluorescencia confocal de células SK-Mel-103 transfectadas con Cherry-GFP-LC3, para detectar la formación de autofagosomas (35 focos rojos y verdes) y autolisosomas (focos únicamente rojos), tras el tratamiento con BO-110 o rapamicina 25 nM.

50 El panel D muestra el efecto inhibitorio de bafilomicina 100 μ M (Bafil), Cloroquina 20 μ M (Chlor) o pepstatina A 10 μ g/ml (PEP) sobre la muerte celular estimada mediante exclusión de azul de tripano 20 horas después del tratamiento con vehículo (barras blancas) o BO-110 (barras negras) Los datos se muestran como medias \pm SEM de tres experimentos independientes.

55 El panel E muestra imágenes de fluorescencia confocal de células SK-Mel-103 tratadas con BO-110 (fotografía superior) o con BO-110 en presencia de cloroquina (fila inferior de fotografías) y transfectadas de forma estable con EGFP-Rab5 de tipo salvaje (en la figura, columna de la izquierda) o incubadas con BO-110 marcado con Fluor Red (columna de fotografías intermedia). Puede observarse la internalización de BO-110 en células de melanoma en ausencia o presencia de cloroquina.

60 El panel F muestra imágenes de fluorescencia confocal para visualizar la proteólisis dependiente de lisosomas por la existencia de escisión y liberación de DQ-BSA fluorescente (que da como resultado fluorescencia verde, tanto en las células SK-Mel-103 tratadas con vehículo (Control) como con BO-110. En presencia de cloroquina (Chlor: fila intermedia de fotografías), no se observa señal de fluorescencia en la columna de DQ-BSA (columna intermedia). Se obtuvieron también imágenes simultáneas de las células en presencia de LysoTracker-Red (LTR-Red: columna izquierda de fotografías) para visualizar el compartimento lisosomal, que dio origen a señal en las tres filas de fotografías.

65

5 El panel G muestra un gráfico de barras que representa la colocalización de las señales correspondientes a DQ-BSA y LysoTracker-Red en las células del ensayo del panel F (Ctrl.: control, barras con relleno negro, ■; Cl: cloroquina, barras sin relleno; BO-110, barras con relleno gris, ▒). La colocalización se estima en un mínimo de 150 células en dos experimentos independientes, y se expresa con respecto al valor obtenido en las células de control (u.a.: unidades arbitrarias de fluorescencia).

10 El panel H muestra imágenes de inmunofluorescencia confocal de focos de fluorescencia debido a GFP-LC3 (verde en la señal original, indicativa de localización de autofagosomas), y LysoTracker (rojo en la señal original, indicativa de la presencia lisosomas) en SK-mel-103 después del tratamiento con BO-110 o tampón de control, según se indica en las imágenes. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (fotografía superior, con señal azul en el original). En la fila inferior se muestra la superposición de las tres imágenes anteriores, que proporcionan un color amarillo o naranja en áreas que presentaban señal verde y roja, imágenes correspondientes a GFP-LC3 y LysoTracker respectivamente, lo que indica que las señales correspondientes a GFP-LC3 y a LysoTracker se localizan en las mismas áreas.

15 El panel I muestra imágenes de microscopía confocal en tiempo real de células SK-Mel-103 que expresaban EGFP-LC3 (señal verde en el original) tratadas o bien con tampón de control con pIC ("Control") o bien con BO-110 e incubadas en presencia de LysoTracker (señal roja en el original) o Hoechst (señal azul en el original) según se muestra en las imágenes. La superposición de las tres imágenes tomadas (inferior derecho de cada tratamiento, Control o BO-110), reveló una fuerte colocalización (señal amarilla) entre GFP-LC3 y lisosomas (tal como se esperaba por la formación de autolisosomas) tras el tratamiento con BO-110 pero no tras el tratamiento con el pIC desnudo. En la tercera fila del panel, bajo el resultado de imágenes solapantes, se muestran las gráficas obtenidas al cuantificar la intensidad total de fluorescencia celular en el canal verde en un plano dado (gráfica marcada como "GFP", para EGFP-LC3) y rojo (gráfica marcada como "Lyso", para el LysoTracker). En el caso de las gráficas obtenidas con células tratadas con BO-110, la distribución similar de ambas señales, eGFP-LC3 y LysoTracker es indicativa de colocalización y, por tanto, de la fusión de autofagosomas y lisosomas.

20 El panel J muestra una representación de un análisis basado en la población de células SK-Mel-103 tratadas con pIC (Control) o con BO-110, que representa la intensidad de la señal de EGFP-LC3 (fluorescencia verde, eje X) y LysoTracker (señal roja, eje Y). Los cuadrados incluyen células con alta tinción dual para ambos marcadores.

30 **Figura 7: Tráfico de endosomas y generación y resolución de anisomas tras tratamiento con BO-110.**

35 El panel A muestra imágenes secuenciales de células de melanoma SK-Mel-103 que expresaban EGFP-Rab7, capturadas por microscopía de fluorescencia en tiempo real, en los tiempos indicados tras el tratamiento con BO-110 o vehículo control. Debe observarse que BO-110 dio como resultado la generación de un gran número de vesículas. Los asteriscos marcan las fusiones endosoma-endosoma (a efectos de claridad, se indican sólo algunos ejemplos).

40 El panel B muestra fotografías de microscopía confocal obtenidas de células SK-Mel-103 transfectadas de forma estable con retrovirus que dieron como resultado la expresión de fluorescencia verde por la proteína de fusión EGFP-Rab7 wt (Rab7 de tipo silvestre) (primera y tercera columna de fotografías desde la izquierda, en el segundo caso la imagen se obtuvo en presencia adicional de LysoTracker-Red, según se indica en la columna) o la fusión eGFP-Rab7 T22N incubada en presencia de LysoTracker-Red (columna derecha de fotografías). Las células se trataron adicionalmente con BO-110 10 (fila inferior del panel) o con el vehículo de control (panel superior). Las imágenes se capturaron 10 horas después del tratamiento con BO-110. Las dos columnas de fotografías localizadas más a la derecha contienen valores correspondientes al área media contenida en vesículas recubiertas con Rab7.

45 El panel C presenta una secuencia de microfotografías confocales tomadas en los intervalos de tiempo indicados (en segundos) en las fotografías, que ilustran la fusión e incorporación de lisosomas a vesículas positivas para Rab7, tras el tratamiento con BO-110.

50 El panel D muestra imágenes de microscopía de fluorescencia en tiempo real, de SK-Mel-103 tratadas con BO-110 y transfectadas de forma estable con retrovirus que daban lugar a fluorescencia verde o roja, según se proporciona por GFP-Rab7 wt (GFP-Rab7 en las fotografías), Cherry-LC3 (Ch-LC3 en las fotografías), o fluorescencia azul debido a LysoTracker-Blue (LTR-Blue en la Figura). Las imágenes se tomaron en los intervalos de tiempo indicados (minutos) 1 hora después del tratamiento. Las flechas marcan la primera secuencia en la que se pudo visualizar cada uno de los marcadores indicados.

55 El panel E muestra la incorporación de LC3 en la superficie de las vesículas con Rab7 endosómico antes de su internalización y posterior degradación. Estas estructuras híbridas endosoma/LC3 (anisomas) se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia en tiempo real de células SK-Mel-103 que expresaban EGFP-Rab7 o Cherry-LC3 (Ch-LC3 en las fotografías).

60 **Figura 8: La citotoxicidad de BO-110 es dependiente de la activación de caspasas efectoras y reguladoras.**

65 El panel A muestra el porcentaje de muerte celular provocado por el tratamiento de células SK-Mel-147 con PEI como

tampón de control (Ctr, representado por barras sin relleno), pIC (barras con relleno gris) o el complejo BO-110 (barras con relleno negro), en presencia de los compuestos indicados bajo cada uno de los gráficos: el vehículo (tampón de control sin PEI) (gráfico izquierdo), vitamina E (+Vite, gráfico intermedio) o el inhibidor de caspasa ZVAD-fmk (+ZVAD, derecha). El porcentaje se midió en todos los casos con exclusión de azul de tripano.

5

El panel B muestra los resultados de una inmunotransferencia de extractos de las líneas celulares de melanoma metastásico (indicados en el lado izquierdo). Se obtuvieron recogiendo las células en los tiempos postratamiento indicados (en horas, en cada carril). Los tratamientos se indican en los tiempos: NT (sin tratamiento: poblaciones de células control incubadas en presencia de tampón), PEI, pIC, complejo BO-110 o Bor (bortezomib 25 mM). Junto a cada imagen se indica la proteína analizada: casp-9 (caspasa 9), casp-8 (caspasa 8) o tubulina (control de carga). Los números situados en el lado derecho indican la masa relativa, en kDa, correspondiente a las bandas proteicas presentes a esa altura.

10

El panel C muestra los resultados de una inmunotransferencia de extractos de la línea celular SK-Mel-103, obtenidos recogiendo las células después del tratamiento indicado en horas (24 y 48 horas). Los tratamientos se indican en los carriles, bajo los tiempos: NT (sin tratamiento: poblaciones de células control incubadas solamente en presencia de tampón), PEI, pIC y complejo BO-110. Junto a cada fotografía se muestra la proteína analizada: casp-9 (caspasa 9), casp-8 (caspasa 8), casp-7 (caspasa 7), casp-3 (caspasa 3) o tubulina (control de carga).

15

20 **Figura 9: BO-110 desencadena apoptosis mediante NOXA independientemente del estado de p53 y sin inducir activación compensatoria de MCL-1.**

El panel A muestra fotografías de las inmunotransferencias de células SK-Mel-28 (parte superior) o SK-Mel-147 (parte inferior) obtenidas recogiendo las células en los tiempos indicados después del tratamiento (en horas). Los tratamientos se indican sobre los tiempos: NT (sin tratamiento: poblaciones de células control incubadas solamente en presencia de tampón), PEI, pIC, complejo BO-110 o Bor (bortezomib 25 mM). Junto a cada imagen se indica la proteína cuyo nivel se analizó: NOXA, Mcl-1 o tubulina (control de carga).

25

El panel B muestra dos gráficos separados que representan los niveles relativos de Mcl-1 (parte superior) y NOXA (gráfico inferior) calculados por densitometría a partir de las inmunotransferencias obtenidas de células SK-Mel-28 en función del tiempo desde que se indica el tratamiento, representados como el porcentaje referido al valor correspondiente obtenido en las células control sin tratar. Junto a cada curva se indica el tratamiento al que corresponde.

30

El panel C muestra fotografías tomadas de inmunotransferencias de extractos celulares totales de SK-Mel-103, obtenidas recogiendo las células después del (tiempos indicados en horas) para cada grupo de tratamiento. Los tratamientos se indican en cada carril: NT (sin tratamiento: poblaciones de células control incubadas en presencia de tampón), PEI, pIC, complejo BO-110 o Bor (bortezomib 25 mM). Junto a cada imagen se muestra la proteína cuyo nivel se analizó: NOXA, Bcl-xL, Bcl-2 o tubulina (control de carga). En la parte inferior del panel se indica el porcentaje de muerte celular observado después del tratamiento.

35

40

El panel D muestra imágenes de inmunotransferencias diseñadas para evaluar la expresión de la proteína NOXA. Se obtuvieron extractos de células de melanoma SK-Mel-103 tratadas durante 24 h con pIC o BO-110 dos días después de la infección con un vector lentiviral que expresaba un ARNph inactivo (sh Ctrl) o un ARNph dirigido contra NOXA.

45

El panel E muestra un gráfico que representa las tasas de muerte de células de melanoma SK-Mel-103 (expresada como porcentaje de células muertas), transducidas bien con un ARNph control (barras con relleno gris claro, ■) o un ARNph dirigido contra NOXA (barras con relleno negro, ■) e incubadas con pIC o BO-110 durante 24 h (NT: sin tratamiento, células incubadas con el vehículo de administración).

50

El panel F corresponde al efecto inhibitor de la regulación negativa de MDA-5 sobre la inducción de NOXA por BO-110, representado por los niveles de NOXA (expresados en unidades arbitrarias, u.a.) en células SK-Mel-103 transducidas con ARNph control o un ARNph dirigido contra MDA-5. Los niveles de NOXA se midieron por densitometría y se representaron con respecto a los controles sin tratar (N Inf: ninguna interferencia, niveles a los que se dio el valor 1 en el caso del tratamiento con pIC desnudo y 100 en el caso del tratamiento con BO-110).

55

Figura 10: Actividad anti-melanoma de BO-110 en ratones inmunocompetentes

Panel A.

60

Panel superior. Esquema del enfoque experimental para generar xenoinjertos subcutáneos de células de melanoma B16 en ratones singénicos C57BL/6. También se indican tiempos de tratamiento para inyecciones peritumorales de 50 µg (en 100 µl) (2 ng/kg) de pIC desnudo o en complejo con PEI. Los grupos de control recibieron 100 µl de glucosa al 5 % o solamente PEI.

65

Panel inferior. Representación de crecimiento de tumores estimado por mediciones de calibrador en los puntos temporales indicados. Se analizaron 10 tumores por grupo experimental. Rutinariamente se sacrificaron ratones cuando el volumen tumoral superó 1000 mm³. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

- 5 El panel B muestra la implantación intravenosa de células de melanoma B16-eGFP en ratones C57BL/6 singénicos para tratamientos intravenosos posteriores a la implantación con 10 µg (en 100 µl) (1 ng/kg) de pIC o BO-110, en los puntos temporales indicados. Los grupos de control recibieron PEI en glucosa 5 %, 14 días después de inoculación de células, se sacrificó a los ratones y los pulmones se procesaron para formación de imágenes de fluorescencia.
- 10 El panel C muestra un gráfico de barras que representa el número de metástasis de pulmón observado en cada uno de los grupos de tratamiento obtenido por recuento manual de metástasis externas (C). (P* < 0,01 entre NT/PEI y BO-110; n=5; test generalizado de Mann-Whitney).

15 **Figura 11: IFN-α se induce por BO-110 pero no es suficiente para provocar la muerte de las células de melanoma.**

- 20 El panel A muestra células de melanoma B16 y macrófagos derivados de médula ósea tratados con pIC o BO-110, se aisló ARN y se realizó PCR cuantitativa, con respecto a la diana de IFN IFIT-1. Se muestran los niveles de ARNm relativos de IFIT-1 estimado con respecto a las células control sin tratar.
- 25 El panel B muestra células de melanoma SK-Mel-103 tratadas con las concentraciones indicadas de IFN-α humano recombinante, comenzando desde 10 pg/ml ya con mayor la cantidad secretada de IFN-α en células tratadas con BO-110 determinada por ELISA). La muerte celular se determinó a 24 horas después del tratamiento. Como controles, las células se trataron en paralelo con BO-110 (24 h). Obsérvese que los niveles elevados de IFN-α no son citotóxicos para las células de melanoma, y no pueden reproducir la eficacia de la mortalidad por BO-110.

30 **Figura 12: La inmunosupresión no compromete la capacidad de BO-110 para bloquear la diseminación metastásica del melanoma.**

- 35 El panel A muestra la generación y tratamiento de metástasis de pulmón con melanoma dirigida por B16 en ratones Beige con SCID (inmunodeficiencia grave para linfocitos NK, B y T). Las imágenes corresponden a fotografías tomadas bajo luz visible o fluorescente de pulmones representativos de ratones inoculados i.v. con células de melanoma B16, y tratados con PEI, pIC o BO-110. Las imágenes se capturaron 14 días después de la inyección de células.
- 40 El panel B muestra una representación del número medio de metástasis inducidas por B16 como se indica en el panel A (P* < 0,01 entre los grupos de tratamiento con PEI o pIC y BO-110; n=5; test generalizado de Mann-Whitney).
- El panel C muestra análisis histológico de metástasis de pulmón desencadenada por B16 en ratones tratados con PEI, pIC o BO-110. Se muestran tinciones representativas con hematoxilina y eosina de pulmones de los grupos de tratamiento indicados y se visualizan a dos aumentos diferentes (10x y 40x).
- 45 El panel D muestra la generación y tratamiento de metástasis de pulmón desencadenada por SK-Mel-103 en ratones Beige con SCID (inmunodeficiencia grave para linfocitos NK, B y T). Las imágenes corresponden a fotografías bajo luz fluorescente o visible, con tinción de hematoxilina y eosina (fila inferior) de pulmones representativos ratones inoculados i.v. con células de melanoma SK-Mel-103 y tratados con PEI, pIC o BO-110.
- El panel E muestra una representación del número medio de metástasis inducidas por SK-Mel-103 como se indica en el panel D. (P* < 0,01; n=5, test generalizado de Mann-Whitney)

50 **Figura 13: Inhibición de la diseminación de metástasis propagada mediante BO-110 en ratones Tyr::NRAS^{Q61K} x INK4a/ARF^{-/-}.**

- 55 El panel A muestra un gráfico de Kaplan-Meier con respecto a supervivencia sin progresión de metástasis en ratones Tyr::Ras^{Q61K} x INK4a/ARF^{-/-} tratados con DMBA para inducir lesiones pigmentadas y tratados después con PEI en glucosa al 5 % (Control: Ctrl.), pIC o BO-110.
- 60 El panel B muestra gráficos de barras para el número medio acumulativo de neoplasmas melanocíticos cutáneos desarrollados por cada uno de los grupos de ensayo del panel A. El recuento se realizó cada 5 días y los tumores se agruparon por intervalos de tamaño según se indica en los gráficos.
- 65 El panel C muestra imágenes representativas de secciones transversales (columna de la izquierda) y secciones coronales (columna de la derecha) obtenidas mediante PET/CT dirigida a ensayar la actividad metabólica (incorporación de 18F-FDG), de ejemplos representativos de ratones tratados con PEI en glucosa al 5 % (control), pIC desnudo o BO-110. Los tumores están rodeados por líneas blancas discontinuas. Los asteriscos indican la posición de los corazones de los animales.

El panel D muestra tinciones de hematoxilina – eosina de muestras de lesiones melanocíticas extraídas de cada uno de los grupos de tratamiento descritos en el panel A.

- 5 El panel E muestra tinciones de hematoxilina – eosina de muestras de tejido de piel, corazón, hígado o pulmón (según se indica a la izquierda de las fotografías) de ratones tratados con el vehículo de glucosa al 5 % (Control) o con BO-110, que demuestran la ausencia de toxicidad asociada al tratamiento con BO-110 en los compartimentos de células normales.

10 **Figura 14. Actividad citotóxica de BO-110 en una diversidad de células tumorales.**

15 El panel A representa el porcentaje de muerte celular en diferentes líneas celulares tumorales: carcinoma de páncreas (Pa), colon (C), vejiga (Bi), glioma (G), mama (Br), melanoma (M), próstata (Pr), pulmón (L) y ovario (O), estimado por ensayos de exclusión de azul de tripano realizados 18 horas (barra izquierda) y 30 horas (barra derecha) después del tratamiento con BO-110. Los datos se representan como medias \pm SEM de tres experimentos independientes realizados con las líneas celulares indicadas.

20 El panel B muestra imágenes de campo claro representativas de las siguientes líneas celulares tumorales: MiaPaCa (páncreas), BT549 (mama), 639V (vejiga) y T98G (glioblastoma) después de 24 horas de tratamiento con vehículo o BO-110, según se indica. Aunque BT549 era inicialmente resistente a BO-110, finalmente colapsa en ensayos de viabilidad a largo plazo (véase panel B). 639V y T98G son altamente sensibles al efecto citotóxico de BO-110.

25 El panel C muestra ensayos de viabilidad de las líneas celulares tumorales indicadas después de 24 horas de tratamiento con vehículo o BO-110. Para ensayo de viabilidad corto, las células tratadas se fijaron 24 horas después del tratamiento y se tiñeron con violeta cristal para visualización de formación de células en colonia. Para ensayo de viabilidad a largo plazo, un décimo de las células tratadas durante 24 horas se sembró en placas y se fijaron y tiñeron con violeta cristal 48 horas después.

30 **Figura 15. La muerte celular inducida por BO-110 es dependiente de la activación de MDA-5, Noxa y Autofagia en líneas celulares tumorales.**

35 Esta figura muestra inmunotransferencias de extractos celulares totales aislados de las siguientes líneas celulares tumorales: BT549 (mama), 639V (vejiga) y T98G (glioblastoma) después de 24 horas de tratamiento con vehículo (indicado como “-”) o BO-110 (indicado como “+”). Las proteínas analizadas fueron: MDA-5_{FL} (MDA-5 de longitud completa), MDA-5_C (MDA-5 escisión), NOXA, Caspasa-9 o tubulina (control de carga). Obsérvese la mayor inducción de NOXA y MDA-5_{FL} y la escisión de Caspasa-9 y MDA-5_C se producen en las células tumorales más sensibles a BO-110.

EJEMPLOS

40 Los ensayos de los ejemplos descritos a continuación se llevaron a cabo con los siguientes materiales y técnicas experimentales:

Células y cultivo celular

45 Las líneas celulares de melanoma metastásico humano SK-Mel-19, SK-Mel-28, SK-Mel-103 y SK-Mel-147 y las células de ratón B16 ya se han descrito (Soengas *et al.* 2001). Estas células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Life Technologies, Rockville, MD, Estados Unidos) complementado por suero bovino fetal al 10 % (Nova-Tech Inc., Grand Island, NY, Estados Unidos).

50 Los melanocitos humanos, se aislaron de prepucios de recién nacidos humanos como se ha descrito (Fernández *et al.*, 2005) y se mantuvieron en Medio 254 complementado con factores de crecimiento de melanocitos (HMG-1) que contenían 12-miristato-13-acetato de forbol 10 ng/ml (Cascade Biologics, Portland, OR, Estados Unidos).

55 Los fibroblastos humanos se aislaron de prepucios de recién nacidos humanos y se mantuvieron en medio DMEM con suero bovino fetal al 10 %.

60 Además, se obtuvieron células de otros tipos tumorales de un panel de 60 líneas celulares tumorales humanas, que representan nueve tipos tisulares tumorales, usados por el programa de exploración de fármacos antineoplásicos del Instituto Nacional del Cáncer (NCI). Para tumor de páncreas las líneas celulares seleccionadas fueron: IMIMPC2, MiaPaCa, Aspc1, A6L, SKPC-1 y Panc-1; para cáncer de colon: CACO. SW480 y SW1222; para cáncer de vejiga: RT112, MGHU4, 639V, 253J, MGHu3 y SW1170; para glioma y glioblastoma: U87MG, U251 y T98G; para cáncer de mama: MDA-231, MCF7 y T47D; para cáncer de próstata: LNCaP, PC3 y DU145; para cáncer de pulmón: H1299 y NCIH460; y para cáncer de ovario: NCI H23 y SK-OV-3.

65 Todas las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Life Technologies, Rockville, MD, Estados

Unidos) complementado con suero bovino fetal 10 % (Nova-Tech Inc., Grand Island, NY, Estados Unidos).
Generación de pIC en complejo con PEI (BO-110).

5 El análogo sintético de ARN^{bc}, pIC, se adquirió de InvivoGen (San Diego, CA). Los reactivos jetPEITM, jetPEI-FluorTM y la formulación invivo-jetPEITM se adquirieron de Polyplus-transfection (Ikirch, Francia) Estos últimos reactivos, que contienen un derivado lineal de la polietilenimina, se utilizaron para formar complejo de pIC a una relación N/P (restos de nitrógeno de JetPEI por fosfato de ARN) de 1 a 5 *in vitro* e *in vivo*, de acuerdo con el protocolo del fabricante.

10 A menos que se indique de otra manera, las concentraciones de pIC utilizadas en los cultivos de células fueron de 1 µg/ml, y de 1-2 ng/kg en ratones.

Tratamientos con fármacos y ensayos de muerte celular

15 El bortezomib (Velcade, anteriormente PS-341) se obtuvo de Millenium Pharmaceuticals Inc (Cambridge, MA); la adriamicina (doxorubicina) de Sigma Chemical (St.Louis, MO), y el etopósido de Bristol-Myers Squibb (Nueva York, NY). El antioxidante Tiron y la Vit-E se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO), y el inhibidor general de caspasas ZVAD de R&D System (Minneapolis, MN). La 3-metiladenina (3-MA) se obtuvo de Sigma Chemical (St.Louis, MO). La cloroquina se obtuvo de Sigma Chemical (St Louis, MO, Estados Unidos).

20 Los ensayos de viabilidad celular en respuesta a los tratamientos con fármacos se realizaron tras sembrar melanocitos y células de melanoma al menos 12 horas antes del tratamiento con fármacos. El porcentaje de muerte celular en los tiempos y concentraciones de tratamiento indicados se estimó mediante ensayos convencionales de exclusión de azul de tripano como se ha descrito previamente (Wolter *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2005).

25 Los ensayos de proliferación celular en respuesta a los tratamientos con fármacos se realizaron tras sembrar células tumorales al menos 12 horas antes del tratamiento con fármacos. El crecimiento de células en los tiempos y concentraciones de tratamiento indicados se estimaron por ensayo de tinción de violeta cristal.

Inmunotransferencia de proteínas

30 Para determinar cambios en los niveles de las proteínas, se trataron 2x10⁶ células como se ha indicado y se recogieron a diferentes tiempos tras el tratamiento. Los lisados totales de células se sometieron a electroforesis en geles de SDS en gradientes del 10, 12 o 4-15 % en condiciones reductoras, y posteriormente se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, Estados Unidos). Las bandas de proteínas se detectaron mediante el sistema ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

40 Los anticuerpos primarios incluían: casp-9 y casp-3 de Novus Biological (Littleton, CO, Estados Unidos); casp-8 (Ab-3) de Oncogene Research Products (San Diego, CA, Estados Unidos); casp-7 de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, Estados Unidos); Bcl-xL de BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos); Bcl-2 de Dako Diagnostics (Glostrup, Dinamarca); NOXA de Calbiochem (San Diego, CA, Estados Unidos); MDAp53 de Novocastra Laboratories (Newcastle, Reino Unido); y tubulina (clon AC-74) de Sigma Chemical (St Louis, MO, Estados Unidos). El anticuerpo de MDA-5 se ha descrito anteriormente.

45 Los anticuerpos secundarios fueron anticuerpos anti-ratón o anti-conejo de GE Healthcare. Para cuantificar los cambios en los niveles de proteínas inducidos mediante los diferentes tratamientos se utilizó Image J, considerando los controles sin tratar como referencia para la expresión basal.

ARN de interferencia.

50 El vector lentiviral de ARN^{ph} utilizado para regular negativamente NOXA se ha descrito previamente (Fernández *et al.*, 2005). El vector lentiviral plko utilizado para regular negativamente MDA-5 (secuencia diana, SEQ ID NO: 1) se adquirieron de OpenBiosystems (Huntsville, AL). También se diseñaron oligonucleótidos mezclados para generar el ARN^{ph} control. Los virus se generaron a partir de células 293FT, como se ha descrito, y se utilizaron en condiciones que daban lugar a una eficacia de infección > 80 % (Denoyelle *et al.*, 2006). La regulación negativa de MDA-5 se confirmó mediante inmunotransferencia y RT-PCR (cebador directo de SEQ ID NO: 2 y cebador inverso de SEQ ID NO: 3. Cuando se indica así, el tratamiento con pIC o BO-110 se inició 3 días después de la infección con los correspondientes virus que expresaban ARN^{ph}.

Microarrays de perfiles de expresión

60 Se aisló ARN total de al menos dos experimentos independientes y se purificó con el kit RNeasy (Quiagen). Muestras tratadas con B-110 Se marcaron con 2,5 mg de Cy5- UTP y se utilizaron como referencia en las reacciones de hibridación con 2,5 µg de ARN marcado con Cy3-dUTP resultante de la incubación con pIC o PEI. El ARN marcado se hibridó con la microserie de oligos de dos colores del genoma humano completo (4x44K) de Agilent (Santa Clara, CA, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de lavar, los portaobjetos se exploraron utilizando

un Scanarray 5000 XL (GSI Lumonics Kanata, Ontario, Canadá) y las imágenes se analizaron con el programa GenePix 4.0 (Axon Instruments Inc., Union City, CA), como se ha descrito previamente (Alonso *et al.*, 2007). Las medidas de la intensidad de fluorescencia se sometieron a sustracción automática del fondo. Las relaciones Cy3: Cy5 se normalizaron al valor de la mediana de la relación de todos los puntos. Después de la normalización, se descartaron los puntos con intensidades para ambos canales (suma de medianas) menores que el fondo local. Las relaciones de los restantes puntos fueron objeto de transformación logarítmica (base 2), y los puntos duplicados en las series se ajustaron a la mediana. El agrupamiento de pares no ponderado (UPGMA: grupo de pares no ponderado) de los genes expresados de forma diferencial entre las muestras control y de ensayo se realizó con el Paquete de Análisis de Patrón de Expresión Génica (GEPAS).

Respuesta al tratamiento *in vivo*.

Se adquirieron ratones C57BL/6 hembra de NIH (Bethesda, MA). Los ratones Beige hembra con SCID, que tienen afectada la función de los linfocitos NK, T y B, eran de Charles Rivers (Wilmington, MA). Todos los animales eran de 6-12 semanas de edad al comienzo de los experimentos. El cuidado de los animales se proporcionó de acuerdo con los procedimientos institucionales del Centro del Cáncer de la Universidad de Michigan.

Los injertos en la piel se generaron mediante inyección intracutánea de 10^5 células de melanoma B16. 2 ng/kg de pIC, solo o en complejo con invivoJetPEI se administraron mediante inyecciones peritumorales en los días 7, 11, 15 y 21 posteriores a la implantación del tumor. Los grupos adicionales de tratamiento incluyeron JetPEI como agente único y controles con placebo. El volumen de los tumores se estimó mediante medidas con un calibrador y se calcularon como $V = L \times W^2/2$, en la que L y W indican la longitud y la anchura del tumor, respectivamente.

Los modelos sustitutorios de metástasis pulmonar se generaron mediante inyección i.v. de 4×10^5 células de melanoma B16-eGFP o 5×10^5 células de melanoma SK-Mel-103-eGFP. El tratamiento se realizó los días 3, 6, y 9 mediante inyección i.v. de 1 ng/kg de pIC solo o en complejo con invivoJetPEI. Los pulmones se recogieron 14 días después de la inoculación y las metástasis externas se contaron manualmente y se les asignó un valor según su número y tamaño. Como alternativa, se utilizó un sistema Illumatool TLS LT-9500 de luz de fluorescencia (Lighttools Research, Encinitas, CA, Estados Unidos) y la fluorescencia emitida por las células tumorales se capturó con una cámara Hamamatsu Orca 100 CCD. La implicación de metástasis se controló de forma independiente mediante análisis de la tinción con hematoxilina-eosina de secciones de parafina. Los experimentos se realizaron en grupos de cinco ratones y se repitieron de dos a cuatro veces. Los ratones se sometieron a eutanasia cuando las poblaciones control mostraron signos de malestar o defectos respiratorios.

Los melanomas autóctonos se generaron cruzando los ratones Tyr::N-RasQ61K/o con ratones knockout en Ink4a/Arf en un contexto C57BL/6 (Ackermann *et al.*, 2005). Para la inducción del melanoma en la piel, los ratones se pintaron una vez, a la edad de 8-10 semanas, con 220 μ g de 7,12-dimetilben[a]antraceno (DMBA). Tras el desarrollo de los primeros neoplasmas melanocíticos (lesiones de al menos 1 mm de diámetro), los ratones se trataron 2 veces por semanas con inyecciones intraperitoneales de 1 ng/kg de pIC como agente individual o en complejo con invivoJetPEI. Se contaron los melanomas y los lunares (nevi) y se midió su tamaño en dos diámetros utilizando un calibrador, expresándolo como tamaño medio tumoral, en mm³.

El tamaño de los tumores se evaluó también mediante PET-CT (Tomografía de Emisión de Positrones – Tomografía Computada). La exploración y adquisición de imágenes de PET-CT se llevó a cabo con el sistema de PET-CT para animales pequeños View Explore General Electrics (Fairfield, CT, Estados Unidos). Se inyectaron 15 MBq de 18F-FDG (2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa) para formación de imágenes y adquisición de imágenes de PET y se reconstruyeron usando el algoritmo 3DOSEM. Las imágenes de CT se adquirieron con 16 disparos con una energía de 35 KeV y 200 μ A, y las imágenes se reconstruyeron utilizando el algoritmo FDK. Los melanomas, las metástasis y otros órganos se controlaron independientemente mediante el análisis de secciones de parafina teñidas con hematoxilina-eosina.

Microscopía electrónica de transmisión

Para la microscopía electrónica de transmisión (TEM), las poblaciones de células indicadas se lavaron con tampón de Sorensen 0,1, pH 7,5 y se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % durante 1,5 h, y a continuación se deshidrataron y se incluyeron en resina de Spurr. Después, el bloque se seccionó en secciones ultrafinas de 60-100 nm, que se picaron sobre rejillas de cobre. Para análisis rutinario, las secciones ultrafinas se tiñeron con acetato de uranilo al 2 % y citrato de plomo. Se tomaron microfotografías electrónicas con un microscopio electrónico de transmisión Philips CM-100 (FEI, Hillsbrough, OR) y una cámara digital Kodak 1.6 Megaplus.

Microscopía confocal y de fluorescencia: Cuantificación de los puntos dispersos de GFP-LC3

Una fusión eGFP-LC3 clonada en el vector de expresión pCNA fue un donativo de Gabriel Núñez (Centro del Cáncer de la Universidad de Michigan). eGFP-LC3 y los fragmentos eGFP-Rab7wt, eGFP-Rab7 T22N, eGFP-Rab5wt, eGFP-Cherry-LC3 y Cherry-LC3 se clonaron en el vector lentiviral pLVO-puro para transferencia estable de genes. Las células derivadas de melanoma (es decir, SK-Mel-103) se infectaron con el vector pLVO-GFP-LC3 y se seleccionaron con

puromicina. La emisión de fluorescencia asociada a GFP-LC3 se visualizó utilizando un microscopio de fluorescencia Leica AF6000 y las imágenes se analizaron mediante LAS AF V1.9 (Leica, Solms, Alemania). Para microscopía confocal en tiempo real, los inventores utilizaron un microscopio ultraspectral Leica TCS-SP2-AOBS-UV acoplado a CO₂ y una cámara de incubación a temperatura controlada. Las imágenes se analizaron mediante LCS (Leica, Solms, Alemania). Para los experimentos de colocalización se añadió el LysoTracker™ Red o Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA), a una concentración de 50 nM o 200 nM 10 minutos antes de la obtención de imágenes a una concentración final de 5 µg/ml. Las imágenes de colocalización se analizaron con LAS AF V1.9 (Leica, Solms, Alemania).

Expresión de citocinas.

El interferón alfa humano se midió en sobrenadantes de cultivo mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). El kit de ELISA de IFN- α humano y el hIFN- α recombinante se adquirieron de PBL Interferon Source (Piscataway, NY) y se utilizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante. El nivel de expresión del IFN- α se midió en macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) y células de melanoma B16 mediante PCR a tiempo real. Los BMDM se prepararon, se sembraron en placas y se trataron tal como se ha descrito previamente (Celada *et al.*, 1984). El análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real de los transcritos de ARN de IFIT-1 se realizó utilizando cebadores y sondas TaqMan obtenidas de Applied Biosystems en un detector de secuencias 7700 de Applied Biosystems tras la normalización con β -actina.

Análisis estadísticos.

Los datos de viabilidad se expresan como medias \pm S.E.M., y el análisis estadístico de las diferencias se determinó mediante el test de la t de Student de dos colas. Se consideró significativo $P < 0,05$. Para la evaluación estadística del crecimiento de los tumores y las metástasis *in vivo*, se utilizó el test generalizado de Mann-Whitney Wilcoxon para comparar los valores de variables continuas entre dos grupos. Se consideraron significativos los valores de $P < 0,05$.

Ejemplo 1.- Identificación de inductores de autofagia en células de melanoma por un análisis diferenciador basado en fluorescencia de LC3. Confirmación de la muerte celular autofágica inducida por BO-110 mediante análisis ultraestructurales.

Como se ha analizado previamente, un rasgo distintivo de la autofagia (tanto para inducción de la muerte celular como de la supervivencia), es la relocalización del gen de la proteína de autofagia 8 (ATG8)/LC3 desde el citosol a autofagosomas de reciente formación. Basándose en esta observación, los cambios en la distribución celular de una proteína de fusión GFP-LC3 (p. ej. de un patrón difuso a una tinción focal) se utilizan ampliamente como un marcador de etapas tempranas de autofagia. La presencia de autofagosomas puede confirmarse también mediante microscopía electrónica o microscopía óptica.

1.1. Análisis de fluorescencia basado en LC3

Para abordar el papel de la autofagia en la respuesta del melanoma a los fármacos, se usó un análisis diferenciador basado en GFP-LC3 para explorar con fármacos quimioterapéuticos e inmunomoduladores disponibles en el mercado. Las células de melanoma se transfectaron de forma estable con vectores lentivirales capaces de expresar derivados del marcador de autofagosomas LC3 con GFP, tales como pLVO-eGFP-LC3.

La línea celular humana SK-Mel-103 se seleccionó como el sistema modelo para la exploración inicial, basándose en su fenotipo altamente metastásico y quimiorresistente (Soengas *et al.*, 2001). Se realizaron estudios de validación posteriores en un panel de líneas celulares humanas de diverso fondo genético (véase más adelante).

Se descubrió que una diversidad de fármacos antineoplásicos inducía la emisión focal de fluorescencia de GFP-LC3 sin afectar de forma significativa a la viabilidad celular. Sin embargo, entre los inductores de muerte celular, se descubrió que un complejo de PEI y el mimético de ARNbc ácido poliinosin-policitidílico (BO-110) era particularmente eficaz en el acoplamiento de focos GFP-LC3. Aproximadamente 50 % de las células mostraron una tinción de GFP-LC3 en forma de puntos continuos perceptibles dentro de las 4-6 h de incubación con dosis bajas (0,5-1 µg/ml) de BO-110 (véanse los micrográficos representativos y las cuantificaciones en la **Fig. 1A**, en la **Fig. 1B**). De hecho, los análisis cinéticos indicaron una generación más rápida de focos de GFP-LC3 por BO-110 que por rapamicina (**Fig. 1B**), un control positivo clásico para la inducción de autofagia (Klionsky *et al.*, 2008).

Es interesante que en los puntos temporales tardíos el tratamiento con BO-110 fue capaz de inducir muerte celular, incluso en líneas celulares de melanoma que son intrínsecamente resistentes a agentes de daño para el ADN convencionales tales como doxorubicina o etopósido, como el caso de SK-Mel-103.

El análisis de la proteína LC3 endógena mostró cambios en su movilidad electroforética (**Fig. 1C**), correspondientes a la lipidación característica de esta proteína durante formación de autofagosoma y el requisito estricto de ATG5 para la formación de focos GFP-LC3.

Los autores de la invención no tenían conocimiento de ningún informe previo que hubiera ligado el p1C a la autofagia en células cancerosas. Por ello, los siguientes ensayos se centraron en este compuesto, puesto que podría revelar nuevos elementos para aumentar la comprensión de los sensores intracelulares potenciales de ARNbc para inducir autofagia y muerte de células tumorales.

5 1.2. Análisis ultraestructural del efecto de BO-110 sobre las células

10 La tinción focal de GFP-LC3 en células tratadas con BO-110 descrita en el apartado anterior es coherente con la formación de autofagosomas. Sin embargo, para descartar posibles agregaciones inespecíficas de GFP-LC3 expresada de forma ectópica (Klionsky *et al.*, 2008), la respuesta se analizó independientemente mediante microscopía electrónica (**Fig. 1D**).

15 Las respuestas tempranas (5 h) a BO-110 implicaban una notable acumulación de estructuras densas de electrones unidas a la membrana, que secuestraban residuos celulares (**Fig. 1D**), un rasgo distintivo de autofagosomas. El tamaño y número de estas estructuras era visible como gránulos intracelulares incluso mediante microscopía óptica (**Fig. 1E**).

En puntos temporales posteriores, el tratamiento con BO-110 indujo el colapso celular (**Fig. 1F**, panel intermedio), que se descubrió mediante microscopía electrónica que estaba asociado a la formación de grandes vacuolas fagocíticas, de más de 500 nm de diámetro (**Fig 1F**, panel derecho).

20 La **Fig. 2** muestra un resumen de la evolución en el tiempo de la inducción de la autofagia, mediante microfotografías de fluorescencia seleccionadas tomadas en tiempos diferentes, que pueden verse en microfotografías de redistribución de EGFP a lo largo del tiempo: de una tinción difusa a agregados focales, indicativos de la formación de autofagosomas, un proceso que culmina en un colapso celular generalizado. Las células de control mostraron una tinción difusa durante todo el periodo de ensayo, indicativo de niveles basales de acumulación de LC3.

25 Es interesante que la integridad de las membranas plasmática y nuclear se mantuvo, y que las células tratadas con BO-110 mostraban la condensación de la cromatina característica de los programas de apoptosis. La inducción de autofagia era dependiente de BO-110, pues PEI (Control) tuvo un impacto mínimo en el número o el tamaño de los autofagosomas (**Fig. 1D-F**). En conjunto, estos hallazgos apoyan un efecto citotóxico de BO-110 que implica la formación de autofagosomas, seguido de muerte celular con característica de tipo apoptótico.

Ejemplo 2: Análisis de la sensibilidad de distintas líneas celulares de melanoma humano y murino con p1C conjugado con moléculas catiónicas y selectividad frente a los melanocitos.

35 Para determinar si la actividad de BO-110 pro-autofágico hallada en el estudio inicial realizado con células SK-Mel-103 era un reflejo de una actividad anti-melanoma más amplia, se realizaron ensayos sobre un conjunto adicional de líneas celulares.

40 Se seleccionaron células de melanoma para correlacionarse con acontecimientos frecuentes asociados con melanoma, tales como mutaciones en *BRAF* o *NRAS*, delección de loci *INK4α/ARF* o *PTEN* o regulación positiva de diversos miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2, que se sabe que contribuyen a la progresión y quimiorresistencia del melanoma.

45 Las mutaciones en p53 son poco frecuentes en melanoma (Soengas y Lowe, 2003). Sin embargo, puesto que p53 puede desempeñar un papel clave en la activación de programas apoptóticos y autofágicos, también se realizaron ensayos con la línea celular SK-Mel-28 que expresa una p53 mutante, para determinar si este supresor de tumores se requiere estrictamente para la actividad antimelanoma de BO-110. Además, también se incluyó en el análisis una línea celular de melanoma metastásico de ratón B16, como ejemplo de modelo ampliamente utilizado en la inmunoterapia del melanoma (Wenzel *et al.*, 2008), para evaluar diferencias en la respuesta al tratamiento supuestamente asociadas con diferencias entre especies. En paralelo, se analizaron también melanocitos aislados de prepuccio humano.

El contexto genético de las líneas celulares de melanoma metastásico humano se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1: Contexto genético de las líneas de melanoma metastásico humano

Línea celular	p53	Induc p53	p14 (ARNm)	p16 (ARNm)	BRAF (V599)	NRAS (exón 3)	PTEN (prot)	Apa1-1 (prot)	Casp8 (prot)	Bcl-2 (prot)	Bcl-xL (prot)	Mcl1 (prot)	DOX
SK-Mel-19	Tipo silv.	+	+	+ ^{***}	mut.	Tipo silv.	-	++	++	+++	++	ND	++
SK-Mel-28	L145R	-	ND	+ ^{***}	mut.	Tipo silv.	+	-/+	++	++	++	++	-
SK-Mel-103	Tipo silv. ^R	+	+	+	Tipo Silv.	Q61R	+	-	+	++	+++	+++	-
SK-Mel-147	Tipo silv. ^R	+	-	+ ^{***}	Tipo silv.	Q61R	+	-	+	++	+++	+++	-

El estado mutacional de p53 se determinó por secuenciación directa de los exones 2-10 por RT-PCR. Las muestras con el polimorfismo P72R se indican como R. La inducibilidad de p53 se determinó mediante inmunotransferencia de extractos tratados con doxorubicina (0,5 mg/ml, 12h). Las líneas con altos niveles endógenos de p53 se indican con un asterisco. Los niveles de PTEN, Apaf-1, Casp-8, Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1 se determinaron por inmunotransferencia y se normalizaron con respecto a los melanocitos control. El estado mutacional de BRAF y NRAS se determinó por secuenciación directa de fragmentos genómicos amplificados por PCR de los exones 15 y 3, respectivamente. Las respuestas a doxorubicina (DOX; 0,5 µg/ml, 30h) se catalogan como ++, +, +/-, -, para porcentajes de muerte celular de 100-70, 70-50, 50-30 y <30 %, respectivamente. Las respuestas a BO-110 (1 µg/ml, 30 h) se catalogan como +++, ++, +, para porcentajes de muerte celular de 100-90, 90-60 y 60-40 %, respectivamente. Se indican líneas con altos niveles endógenos de p53 con un asterisco.

Con estas líneas, se realizaron ensayos similares a los descritos en el Ejemplo 1 para la línea celular SK-Mel-103, para verificar la sensibilidad de cada una de estas células a PEI y pIC como agentes independientes o utilizados en combinación. Los resultados se resumen en la **Fig. 3**.

Las cinco líneas celulares de melanoma ensayadas (SK-Mel-19, -28, -103, -147, y B16) murieron con una cinética y sensibilidad similares después del tratamiento con BO-110 (**Fig. 3A**). Es significativo señalar que en todas las líneas de melanoma en las que se realizó el ensayo, la activación temprana de la autofagia por BO-110 se siguió invariablemente de muerte celular.

La microscopía electrónica mostró autofagosomas claros, también en el caso de la línea mutante de p53, SK-Mel-28 (**Fig. 3B**). Como puede apreciarse en la **Fig. 3A** y en las curvas de respuesta a dosis representadas en la **Fig. 4B** (que muestra datos representativos de las líneas correspondientes a cuatro aislados independientes), es importante señalar que, en condiciones que provocaron la muerte del 70 % de las células de melanoma SK-Mel-103 24 horas después del tratamiento, los melanocitos normales siguieron siendo viables y no mostraron marcadores de autofagia.

Es más, como puede apreciarse en la **Fig. 4A**, no se observaron cambios significativos en la morfología, granulación o distribución citosólica de GFP-LC3 en los melanocitos a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones de BO-110. La **Fig. 4C** es indicativa también de que los fibroblastos normales de piel humana también eran más resistentes a BO-110 que las células de melanoma.

Es interesante descubrir que PEI es crítico en su selectividad para células tumorales. Así, la actividad antimelanoma de pIC se redujo en 70-80 % cuando no se incluía PEI en el tratamiento (**Fig. 3A**). Sin PEI, el pIC desnudo fue casi tan ineficaz en las células de melanoma como en los melanocitos, y mostraba una actividad mínima como inductor de autofagia (**Fig. 3B**).

PEI es un vehículo clásico en terapia génica por su capacidad para favorecer la captación por endocitosis de moléculas de ADN y ARN (revisado en Payne, 2007). Las estructuras multilaminares encontradas en las células de melanoma tratadas con BO-110 (véanse las imágenes inferiores de **Fig 2B**), son de hecho coherentes con múltiples acontecimientos de fusión que implican la llegada de híbridos endosoma-lisosoma (anfisosomas) a los autofagosomas (Maiuri *et al.*, 2007).

Ejemplo 3: Activación de MDA-5 por pIC de forma cualitativamente diferente en ausencia y presencia de PEI.

Además de favorecer la endocitosis de las moléculas de ADN o ARN, PEI puede promover el hinchamiento de los endosomas y permitir suministro eficaz del material genético al citosol (revisado en Payne, 2007). Por lo tanto, PEI podría favorecer el acceso de pIC a sensores intracitosólicos. El gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma (MDA-5) es uno de estos sensores (Akira, 2006), y por ello los autores ensayaron si esta proteína era la que desencadenaba la muerte de células de melanoma mediada por BO-110.

La activación de MDA-5 se analizó controlando la escisión proteolítica que separa sus dominios helicasa y de reclutamiento para la activación de caspasas (CARD) durante la muerte celular, como se ha descrito (Kovasovics *et al.* 2002; Barral *et al.*, 2007).

Este análisis se llevó a cabo mediante inmunotransferencia de extractos de células SK-Mel-28 y SK-Mel-147 tratadas con PEI, pIC o BO-110, tras someter estos extractos a electroforesis. Como control positivo de inducción eficaz de muerte celular se utilizó bortozomib. Los resultados se muestran en la **Fig. 5**.

Es interesante que la inmunotransferencia de proteínas reveló una capacidad fuerte y prolongada del complejo de PEI-pIC, BO-110, para inducir el procesamiento de MDA-5 (**Fig. 3A**). El pIC desnudo fue capaz de inducir este procesamiento, aunque a niveles significativamente menores, y no en todas las células ensayadas ni de una manera prolongada (ninguno de los carriles correspondientes a células SK-Mel-28 muestra la banda de 30 kD, característica de la existencia de escisión proteolítica, que debería aparecer a la altura de la flecha en los paneles A y B de la **Fig. 5**) ni de manera prolongada (véase la **Fig. 5A**, en la que la intensidad de la banda de 30 kD disminuye con el tiempo de tratamiento con pIC en células SK-Mel-147).

Para definir la contribución de MDA-5 a la actividad citotóxica de BO-110, se transdujeron células de melanoma, mediante vectores lentivirales, con ARN cortos en horquilla (ARNph) complementarios a MDA-5 para inactivación estable de MDA-5 (véanse las inmunotransferencias de proteínas en la **Fig. 3B**). El ARNph de MDA-5 redujo significativamente la muerte de células de melanoma provocada por BO-110 sin efectos inespecíficos detectables sobre las células control (**Fig 3C**, $p < 0,05$).

Es importante que la inducción y el procesamiento de MDA-5 no fue simplemente una consecuencia de la activación de la maquinaria de muerte celular en las células de melanoma. El tratamiento con bortezomib, un inhibidor de proteasomas capaz de activar en melanoma tanto la ruta apoptótica intrínseca como de receptor de muerte, no tuvo ningún efecto en los niveles o procesamiento de MDA-5 (**Fig. 5A**). Estos resultados ilustran la existencia de diferencias importantes mecánicas en la ejecución de los programas de muerte por BO-110 y otros inductores proapoptóticos.

Ejemplo 4: Los inhibidores farmacológicos de la autofagia comprometen la actividad citotóxica de BO-110.

A continuación, los ensayos se centraron en los mecanismos implicados en la ejecución de la muerte celular inducida por BO-110. La 3-metiladenina (3-MA) y cloroquina (Clor) se utilizan frecuentemente para la validación independiente de los mecanismos de autofagia, por su capacidad para interferir con la formación de autofagosomas o la actividad autolisosomal, respectivamente (Maiuri *et al.*, 2007; Klionsky *et al.*, 2008).

Para comprobar si esta interferencia sucedía en células de melanoma tratadas con BO-110, se sometieron al tratamiento con 3-metiladenina o cloroquina células de melanoma SK-Mel-103 12 horas después del tratamiento con BO-110 o con el tampón control (vehículo). Los resultados se muestran en la **Fig. 6**.

Como se mostró mediante microscopía de fluorescencia (**Fig. 6A** y **Fig. 6B**), 3-MA bloqueó la formación de focos de GFP-LC3 mediada por BO-110. En presencia de cloroquina, se acumularon autofagosomas, pero resulta interesante que esta inducción no resultó productiva como inductora de muerte (**Fig. 6C**, en la que se observa que el porcentaje de células muertas observado en presencia de cloroquina es inferior al observado con pepstatina A, E64d o la combinación de ambos). Por ello, estos resultados apoyan un escenario en el que la actividad citotóxica de BO-110 no es un subproducto pasivo de la formación de autofagosomas: la actividad lítica del lisosoma es un mediador esencial de la muerte de células de melanoma por BO-110.

Ejemplo 5: BO-110 provoca la fusión de autofagosomas/lisosomas para posteriormente provocar el desencadenamiento de programas de muerte celular.

Si el autolisosoma es un controlador clave de BO-110, el bloqueo de las hidrolasas lisosomales debería proteger a las células de melanoma durante el tratamiento con BO-110. No es factible bloquear toda la actividad dependiente de lisosomas, puesto que en este orgánulo se pueden localizar múltiples enzimas con dianas solapantes (Fehrenbacher y Jaattella, 2005). Aun así, los inhibidores de proteasas de amplio espectro E64d y pepstatina A pueden aportar información útil sobre la actividad lisosomal, pues estos compuestos bloquean de forma eficaz diversas catepsinas (B, D, y L) en los autolisosomas (Klionsky *et al.*, 2008). Por ello, se realizó un ensayo en el que se comparó el efecto de cloroquina, pepstatina A o E64d sobre la muerte celular 20 horas después del tratamiento con el tampón control o BO-110. Los resultados se muestran en la **Fig. 6C**, que se ha mencionado previamente. En particular, la pepstatina A y el E64d redujeron en 50 % el grado de muerte celular provocada por BO-110.

Para confirmar que las vesículas correspondían a las anteriores de estructuras multivesiculares grandes que implicaban endosomas grandes, que su vez reclutan múltiples autofagosomas (para generar las estructuras híbridas conocidas como anfisomas) y que estas vesículas no eran el resultado de autofagosomas parados, en los que los lisosomas no habían sido reclutados o eran disfuncionales, o los autofagosomas fueron un resultado de acumulación de material degradado de forma inadecuada, las células de melanoma se transfectaron con fusiones de GFP y Cherry-LC3. Las señales de Cherry-GFP-LC3 dan lugar a autofagosomas de fluorescencia roja y verde, debido a las dos proteínas fluorescentes (Cherry y GFP), pero pierden la señal de GFP (verde) en el ambiente ácido de los autolisosomas.

El uso de esta estrategia reveló que, de hecho, BO-110, de forma similar a la rapamicina, inducía la formación de autolisosomas en células de melanoma, como indica la presencia de focos LC3, únicamente rojos, en la **Fig. 6C**. La cloroquina, de forma coherente con los ensayos previos, bloqueó la muerte de células de melanoma desencadenada por BO-110 (**Fig. 6D**), sin afectar a la captación endosómica de este mimético de ARNbc (como se determinó por colocalización de BO-110 marcado con FluoRed, con proteína temprana endosómica Rab5 fusionada con GFP (**Fig. 6E**)). Se observaron efectos inhibidores similares usando los inhibidores de proteasa de amplio espectro E64d y pepstatina A y el bloqueador de ATPasa vacuolar bafilomicina, (**Fig. 6D**), apoyando de nuevo un modo de acción de BO-110 dependiente de lisosomas.

Para determinar de forma independiente la actividad lisosomal durante el tratamiento con BO-110, se ensayó la capacidad de las células para procesar DQ-BSA (un derivado de BSA, cuya fluorescencia verde se interrumpe a menos que la molécula se escinda mediante enzimas proteolíticas). Como se muestra en la **Fig. 6F**, DQ-BSA se escindió de forma eficaz en presencia de BO-110. Obsérvese que la emisión de DQ-BSA se detectó en los lisosomas, como indica la colocalización con LysoTracker-Red, un colorante cuya permeabilidad celular es dependiente del pH y emite fluorescencia roja cuando se incorpora en lisosomas funcionales ácidos). El resultado contrasta con la emisión mínima

de fluorescencia debida a DQ-BSA observada en las células SK-Mel-103 tratadas con BO-110 cuando la actividad lisosomal se bloqueó con cloroquina (**Fig. 6F** y **Fig. 6G**).

5 Para caracterizar adicionalmente la capacidad de BO-110 de provocar el inicio y desarrollo completo de procesos de autofagia, se visualizó la fusión de autofagosomas y lisosomas mediante microscopía confocal. Con este objetivo, se trataron con BO-110 o los correspondientes tampones como control, células SK-Mel-103 que expresaban de forma estable GFP-LC3, y se incubaron en presencia de LysoTracker-Red. El análisis de la emisión dual de fluorescencia verde y roja (para fusión GFP-LC3 y LysoTracker, respectivamente), basado en las células individuales y en la población de células, mostró una colocación clara de autofagosomas y lisosomas (véanse las microfotografías representativas de la fluorescencia en las **Fig. 6H** y **6I** y las correspondientes cuantificaciones en la **Fig. 6J**). Es importante que esta colocación fue un acontecimiento temprano en las respuestas desencadenadas por BO-110 (ya detectable en las 4 – 8 h tras el tratamiento), y precedió a un colapso celular organizado.

15 Una vez determinado que los autofagosomas se fusionan con lisosomas activos en respuesta a BO-110, se comprobó si estos orgánulos interactuaban con los endosomas o se reclutaban por ellos. En primer lugar, se comprobó la dinámica endosómica en células de melanoma que expresaban GFP fusionada con el marcador tardío endosómico Rab7 (Luzio *et al.*, 2007). En las células de melanoma sin tratar (panel izquierdo de **Fig. 7A**), se detectó la generación basal de endosomas y su resolución (es decir, la reducción progresiva de tamaño). Sin embargo, el tratamiento con BO-110 potenció notablemente la actividad de los endosomas, induciendo una generación prolongada, en múltiples olas, de endosomas (paneles intermedio y derecho de la **Fig. 7A**). Se descubrió que estos endosomas estaban llenos de lisosomas como se determinó mediante la formación de imágenes dobles de GFP-Rab7 y LysoTracker-Red (**Fig. 7B**). Además, la microscopía de intervalos de tiempo reveló rápida cinética de múltiples reclutamientos de lisosomas a los endosomas recubiertos con GFP-Rab7, como se muestra también en las series secuenciales de acontecimientos de fusión en la **Fig. 7C**. Es importante señalar que, como se muestra en la **Fig. 7B** (paneles derechos), la fusión de endosomas y lisosomas se inhibió de forma significativa si las células sobreexpresaban Rab7-T22N, un conocido mutante negativo dominante de esta proteína. En total, estos resultados revelaron una movilización dinámica de los compartimentos endo/lisosomales en células tumorales tratadas con BO-110.

30 **Ejemplo 6: BO-110 conecta la autofagia con caspasas apoptóticas.**

Las proteasas lisosomales pueden tener un impacto sobre los programas de muerte a múltiples niveles (Maiuri *et al.*, 2007; Hoyer-Hansen y Jaattella, 2008). En el caso de las mitocondrias, pueden desregular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o provocar la intervención de caspasas apoptóticas clásicas (la caspasa reguladora casp-9 y las efectoras casp-3 y casp-7). También pueden responder a la activación lisosomal rutas extrínsecas dependientes de la casp-8 (Fehrenbacher y Jaattella, 2005). Para abordar la implicación de ROS en el modo de acción de BO-110, el tratamiento con este complejo se realizó en presencia de vitamina E, Trolox o Tiron, neutralizantes con diferente actividad antioxidante, y el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk. Los resultados al analizar los resultados sobre la muerte celular en cada uno de estos casos se muestran en la **Fig. 8A**, cuyos datos obtenidos con la vitamina E se muestran como un caso representativo de los resultados obtenidos con los antioxidantes químicos mencionados a las dosis de estos reactivos que bloquean la apoptosis en melanoma controlada por ROS (Fernández, 2006). Como puede observarse en la figura, la presencia de estos agentes antioxidantes, no se observaron efectos significativos sobre la muerte celular provocada por BO-110. En cambio, el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk inhibió la muerte por BO-110 en 70 %. En conjunto, estos resultados apoyan un mecanismo dependiente de caspasas activado corriente abajo de un programa de autofagia.

45 El procesamiento de caspasas se promovió de hecho de forma eficaz por BO-110 según se determinó mediante inmunotransferencia de extractos de células recogidas después de distintos tiempos tras someterse a ningún tratamiento (NT) salvo el tampón control sin PEI o tratamiento con PEI, pIC, el complejo BO-110 o el inductor conocido de escisión de caspasas, bortezomib (**Fig. 8B** y **Fig. 8C**). La **Fig. 8B** compara la capacidad de PEI, pIC y BO-110 para inducir el procesamiento apoptótico de las caspasas 8 y 9 en diferentes líneas de melanoma metastásico: la activación eficaz de las caspasas 9 y 8 era claramente evidente 20 h después del tratamiento con BO-110 en todas las líneas celulares de melanoma humano ensayadas, de forma análoga a lo que se observó con bortezomib. Además, la cinética y el grado de procesamiento de las caspasas por BO-110 eran altamente uniformes (**Fig. 5B**), independientemente del estado mutacional de BRAF (p.ej. SK-Mel-19), NRAS (SK-Mel-103, SK-Mel-147), o p53 (SK-Mel-28).

55 La **Fig. 8C** muestra los resultados de un ensayo similar, realizado con la línea SK-Mel-103, que emprendió un análisis más completo incluyendo, además de las caspasas apoptóticas 9 y 8, las caspasas efectoras 7 y 3. Se llevó a cabo el mismo ensayo con la línea SK-Mel-147, que dio resultados similares. El procesamiento eficaz de las casp-9, 3 y 7 en SK-Mel-103 y -147 fue particularmente relevante. Estas líneas tienen bajos niveles de Apaf-1 y son muy ineficaces reclutando el apoptosoma casp-9/Apaf-1 (Fernández *et al.*, 2005; Soengas *et al.*, 2006) en respuesta a agentes antineoplásicos clásicos tales como doxorubicina, etopósido o cisplatino (véase el gráfico en la **Fig. 1C**). Por lo tanto, estos resultados muestran una capacidad superior de BO-110 para activar programas apoptóticos y eludir mecanismos inherentes de resistencia a fármacos quimioterapéuticos normales.

65

Ejemplo 7: Activación de muerte celular por BO-110 en ausencia de efectos compensatorios sobre los miembros de la familia de Bcl-2 antiapoptóticos.

5 Para analizar con más detalle el modo de acción de BO-110, y para identificar acontecimientos que pueden activarse únicamente por este agente, se comparó la respuesta al fármaco con los efectos de bortezomib. Este agente se seleccionó porque es también un potente activador de la maquinaria apoptótica en las células de melanoma (Wolter *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2006).

10 Sin embargo, se esperaba que el bortezomib y BO-110 fueran distinguibles desde el punto de vista mecánico. El bortezomib se dirige al proteasoma y no el lisosoma (Qin *et al.*, 2005). Además, como se muestra en la **Fig. 5A**, el bortezomib mata las células de melanoma sin inducir o procesar MDA-5. El bortezomib también es interesante porque puede promover una acumulación masiva del NOXA proapoptótico, pero también inducir una regulación positiva, rápida y drástica, de su factor antagonista antiapoptótico MCL-1 (Fernández *et al.*, 2005), un miembro de la familia de Bcl-2. Es importante que MCL-1 actúa como un mecanismo interno de inhibición del proteasoma y bloquea el efecto antitumorigénico de Bortezomib *in vitro* e *in vivo* (Wolter *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2006).

Para evaluar las similitudes y diferencias entre bortezomib y pIC (desnudo o en complejo con PEI), las células de melanoma se incubaron con cada uno de estos compuestos y se recogieron extractos en diferentes momentos después del tratamiento para evaluar los niveles de NOXA, MCL-1, y otros miembros de la familia de Bcl-2 (Bcl-xL o Bcl-2). Los resultados se muestran en la **Fig. 9**.

20 Como se muestra en los paneles **A** y **B** de la **Fig. 9**, el pIC desnudo no fue capaz de inducir NOXA de manera uniforme o prolongada en células de melanoma SK-Mel-28 o SK-Mel-147 (células que expresan mutación p53 L145R o p53 wt, respectivamente). Por otra parte, BO-110 indujo NOXA 35, 10 y 5 veces por encima de los niveles basales en SK-Mel-28, SK-Mel-147 y SK-Mel-103, respectivamente (véanse las inmunotransferencias de los paneles **A** y **C** de la **Fig. 9**, y las cuantificaciones representativas de la **Fig. 9B**, de los resultados obtenidos en células SK-Mel-28), enfatizando de nuevo la actividad diferencial entre el pIC desnudo y en complejo con PEI.

30 Con respecto a los reguladores inhibidores de NOXA, los niveles de MCL-1 se indujeron mínimamente por BO-110 (**Fig. 9A** y primer gráfico de **Fig. 9B**). Esto contrasta con el bortezomib, que activa NOXA de forma potente, pero induce una acumulación simultánea de MCL-1, como se ha descrito previamente (Fernández *et al.*, 2005). Otros miembros de la familia de anti-apoptóticos Bcl-2 tales como Bcl-2 y Bcl-xL tampoco se vieron afectados por BO-110 (véanse las inmunotransferencias de SK-Mel-103 en la **Fig. 9C**).

35 En ausencia de mecanismos compensatorios, los niveles relativamente más bajos de NOXA inducido por BO-110 podrían ser suficientes para promover la muerte celular. Para ensayar esta hipótesis, se transdujeron células de melanoma con un ARNph que previamente se había demostrado que inhibía específicamente el ARNm y la proteína de NOXA (Fernández *et al.*, 2005), y usando como un control células infectadas con un vector lentiviral que expresaba un ARNph control inactivo. Como se muestra en la **Fig. 9D**, una reducción del 50 % en la expresión de la proteína NOXA por ARNph inhibió la regulación positiva de NOXA por BO-110 también casi en 50 %, e inhibió la toxicidad de BO-110 (**Fig. 9E**).

40 A continuación, se utilizó ARNph contra MDA-5 para definir los requisitos de esta proteína para la regulación de NOXA mediante BO-110 y se realizó un ensayo como anteriormente pero cuantificando los niveles de NOXA. Los resultados se muestran en el gráfico de la **Fig. 9F**. Es interesante que el ARNph de MDA-5 inhibió los niveles en la proteína NOXA en 70 % (**Fig. 9F**), sin efectos secundarios sobre otros miembros de la familia de Bcl-2.

45 En conjunto, estos resultados desvelan un nuevo punto de acción de MDA-5 en la maquinaria apoptótica controlada por la inducción de NOXA.

Ejemplo 8: Eficacia diferencial de pIC desnudo y BO-110 en ratones inmunocompetentes.

55 A continuación, se evaluó la actividad anti-melanoma de pIC y BO-110 *in vivo*. En modelos de melanoma, el pIC desnudo tiene que administrarse a dosis elevadas o en combinación con otros agentes (p.ej. inhibidores de la síntesis de proteínas) para una activación eficaz de los programas de inmunidad innatos. Los datos obtenidos en los ejemplos anteriores sugirieron que pIC sería significativamente más potente en presencia de PEI.

La respuesta al tratamiento se analizó en primer lugar en un contexto inmunocompetente. Las células de melanoma de ratón B16, bien sin transducir o transducidas con GFP (para facilitar la detección mediante obtención de imágenes de fluorescencia), se implantaron en ratones normales singénicos. Se utilizaron dos estrategias: inyección de células tumorales (i) por vía subcutánea (s.c.) o (ii) intravenosa, para evaluar la progresión del tumor en lugares localizados o como metástasis distantes, respectivamente. Los ratones se trataron con PEI, pIC o BO-110 o 100 µl de glucosa al 5 % (grupo NT).

65 La **Fig. 10A** resume la estrategia experimental para los xenotrasplantes subcutáneos con generación de B16, y la dosificación y programa de tratamiento. En los tiempos de tratamiento se inyectaron inyecciones peritumorales de 2

ng/kg de pIC desnudo o en complejo con PEI.

Es notable que, en todos los casos estudiados, se descubrió que BO-110 era superior a pIC. Así, los ratones con melanomas B16 creciendo subcutáneamente que recibieron el vehículo, PEI o pIC solo, tuvieron que sacrificarse a los 15-25 días después del implante, debido a un crecimiento excesivo de los tumores (**Fig. 10A**). En las mismas condiciones, los melanomas subcutáneos del grupo de tratamiento con BO-110 eran indetectables o significativamente más pequeños (**Fig. 10A**).

La **Fig. 10B** resume la estrategia experimental para la implantación intravenosa de células de melanoma B16-eGFP y el tratamiento posterior con pIC, PEI, BO-110 o glucosa al 5 % (grupo NT). En esta figura también se muestran imágenes de fluorescencia de los pulmones de los animales sacrificados (**Fig. 10B**), y la cuantificación de metástasis de pulmón (**Fig. 10C**). En este experimento, BO-110 era 5 veces más potente que el pIC desnudo también en modelos sustitutorios de metástasis de melanoma en pulmón, como se determinó mediante obtención de imágenes de fluorescencia.

Ejemplo 9: IFN no reproduce los rasgos de inducción de muerte celular de BO-110

pIC es un inductor clásico de la inmunidad celular controlada por el IFN (Wenzel *et al.*, 2008). Los datos expuestos en los Ejemplos anteriores sugerían, sin embargo, que pIC, cuando está en complejo con PEI, también podría actuar de manera autónoma en una célula, lo que puede ser distinguible de las respuestas mediadas por IFN en las células inmunes “profesionales”. Para evaluar esta posibilidad, se ensayaron células de melanoma B16 y macrófagos con respecto a su capacidad para secretar y responder al IFN- α . La RT-PCR indicó que ambos tipos celulares activaron dianas clásicas del IFN- α tales como IFIT-1 (proteína con repeticiones de tetratricopéptidos inducida por IFN) tras el tratamiento con BO-110 (**Fig. 11A**). El PEI fue dispensable para la inducción de dianas del IFN mediada por pIC en macrófagos (**Fig. 11A**). Esto era esperable, pues estas células pueden detectar de forma eficaz el ARNbc viral. Las células de melanoma, sin embargo, fueron incapaces de inducir IFIT-1 solamente con pIC desnudo (**Fig. 11A**).

Para una evaluación directa de la producción de IFN- α humano por las células de melanoma, se realizó un ensayo de Elispot, utilizando IFN- α humano recombinante como control de referencia. Los niveles de IFN- α secretados por las células de melanoma después del tratamiento con BO-110 fueron menores de 10 pg/ml. Para determinar si el IFN- α puede sustituir a BO-110 (es decir, si la secreción de IFN- α es el inductor principal de la muerte celular en melanomas), se añadieron a células de melanoma cantidades crecientes de esta citocina. Es interesante que las dosis elevadas de IFN- α (10 veces superiores a los niveles secretados después del tratamiento con BO-110) fueron incapaces de afectar a la viabilidad de las células de melanoma (**Fig 11B**).

Es interesante señalar también que en los ensayos con microseries mostraron que la respuesta al pIC, además de ser bastante transitoria, se esperaba todos los genes implicados para una respuesta a interferón, como se muestra en la **Fig. 11C**). En cambio, el efecto del BO-110, además de mantenerse, se extendía a transcritos adicionales.

Por ello, estos resultados ilustran diferencias intrínsecas en el reconocimiento y detección de agentes miméticos de ARNbc en macrófagos y células de melanoma.

Ejemplo 10: BO-110 puede inhibir el crecimiento metastásico en un contexto gravemente inmunocomprometido.

Puesto que las células de melanoma son frecuentemente inmunorresistentes, se ensayó si la toxicidad directa de BO-110 dirigida a las células de melanoma seguía siendo eficaz en un contexto altamente inmunodeficiente. Los mecanismos efectores más frecuentes asociados con la inmunotolerancia del melanoma son los defectos en la señalización de células NK, T y B (Kirkwood *et al.*, 2008) Por lo tanto, se ensayó la eficacia de pIC (como agente único o en complejo con PEI) para bloquear el crecimiento del melanoma en ratones Beige SCID, que tiene función de linfocitos NK, T y B alterada.

Para controlar la eficacia en el control de las metástasis de pulmón, las células de melanoma se marcaron con GFP y se inyectaron por vía intravenosa, siguiendo el esquema de tratamiento como se describe en la **Fig. 10**. Como ejemplos representativos de melanomas de ratón y de seres humanos, se analizaron, respectivamente, melanoma B16 (**Fig. 12**, paneles **A**, **B** y **C**) y SK-Mel-103 (**Fig. 12**, paneles **D** y **E**).

En ambos modelos celulares, BO-110 fue capaz de inhibir el crecimiento de melanomas en el pulmón. La **Fig 12A** muestra la llamativa diferencia en el número de metástasis B16 visibles en la superficie del pulmón después del tratamiento con BO-110 (véase la cuantificación en la **Fig. 12B**). Los análisis histológicos confirmaron también la reducción en el número y el tamaño de los nódulos pulmonares controlados por B16 en el grupo de BO-110 (**Fig. 12C**). Análisis similares mostraron un claro efecto antitumoral de BO-110 (pero no del pIC no en complejo) en el control del crecimiento diseminado de SK-Mel-103 (**Fig. 12**, paneles **D** y **E**). En resumen, los datos de los inventores demuestran un nuevo modo de acción de un mimético de ARNbc, que induce una potente actividad anti melanoma *in vivo* en ratones beige con SCID, que tienen ausencia de un sistema inmune competente (Croy y Chapeau, 1990).

Ejemplo 11: Inhibición del crecimiento metastásico mediante BO-110 en modelos animales del melanoma humano

Para comparar las diferencias entre pIC y BO-110 se usó una situación más relevante. Los ratones Tyr::NRAS^{Q61K} x

INK4a/ARF^{-/-}, desarrollan melanomas con características similares a las de la enfermedad humana (Ackermann *et al.*, 2005). Los ratones se trataron con un tratamiento tópico sencillo de DMBA (7,12-dimetilbenz[a]antraceno, adquirido de Sigma). Una vez que las lesiones pigmentadas alcanzaban 1 mm, se administraron PEI de control, pIC desnudo o pIC conjugado con PEI formulado para suministro *in vivo*, por inyecciones intraperitoneales (i.p.) dos veces por semana.

De nuevo, se observó que la actividad antitumoral de BO-110 era significativamente mayor que la de pIC desnudo, como lo indican las mediciones directas de los tamaños tumorales (**Fig. 13A y 13B**), la actividad metabólica de los tumores mediante PET-CT (**Fig. 13C**) y los análisis histológicos (**Fig. 13A**).

Es interesante que BO-110 duplicó el intervalo de tiempo sin lesiones en progresión (**Fig. 13A**) en los regímenes de dosificación utilizados, sin señales de toxicidad secundaria (véase el análisis de la **Fig. 13D**).

Estos resultados apoyan la viabilidad de los tratamientos basados en la administración de análogos de ARNbc para contrarrestar el comportamiento agresivo de las células de melanoma.

15 **Ejemplo 12. Actividad citotóxica de BO-110 en una diversidad de células tumorales.**

Como los cambios genéticos y epigenéticos presentes en melanoma y que afectan a la sensibilidad de ARNbc y autofagia pueden no conservarse entre diferentes tipos de cáncer, no resultó obvio si BO-110 podría ser terapéuticamente beneficioso en otros tumores malignos neoplásicos. En particular, los tumores de páncreas, colon, vejiga, cerebro, mama, próstata, pulmón y ovarios son agresivos y resistentes a una diversidad de tratamientos, en parte debido a una inactivación pleiotrópica de programas de muerte.

Para definir si BO-110 podría representar una nueva estrategia antineoplásica de un amplio espectro de acción, se seleccionó una serie de líneas celulares aisladas de forma independiente que pertenecen a los tipos anteriormente citados de cáncer del panel bien conocido NCI-60 (**Fig. 14**). Por lo tanto, tomadas en su totalidad, estas líneas abarcan una diversidad de tumores (es decir, carcinoma de páncreas, colon, vejiga, mama, próstata, pulmón y ovario) de fondos genéticos distintos. Como se muestra en la **Fig. 14**, las líneas celulares analizadas tuvieron una sensibilidad a BO-110 similar a los controles de referencia de melanoma. Un corolario de estos datos es que BO-110 es capaz de acoplar una inducción dual de autofagia y apoptosis que conduce a una muerte coordinada y selectiva (sin afectar a la viabilidad de los compartimentos normales) no solamente de melanomas, sino también de células que pertenecen a otros tipos de tumores diferentes, por ejemplo: carcinoma de páncreas, colon, vejiga, mama, próstata, pulmón y ovario.

35 **Ejemplo 13. La muerte celular inducida por BO-110 depende de la activación de MDA-5, Noxa y Autofagia en líneas celulares tumorales.**

Como la sensibilidad a BO-110 no puede predecirse a priori (es decir basándose en el tipo de célula tumoral), fue necesario definir las cascadas de señalización que median la respuesta a BO-110. Los análisis genéticos de alto rendimiento (basados en series de ADNc) en células de melanoma indicaron que BO-110 fue capaz de promover una regulación positiva fuerte del sensor de ARNbc MDA-5, así como el factor proapoptótico NOXA. Resulta interesante que, usando ensayos de inmunotransferencia, los inventores demostraron que de hecho la sensibilidad y resistencia a BO-110 (por ejemplo en las líneas HCT116 o MiaPaCa2) se correlaciona con la capacidad de las células para inducir MDA-5 y NOXA (**Fig. 15**). De forma coherente con los papeles proapoptóticos de BO-110 indicados anteriormente, las líneas celulares sensibles mostraron un claro procesamiento de caspasa-9, que puede visualizarse como cambios en la movilidad electroforética (**Fig. 15**).

REFERENCIAS

1. Ackermann, J., Fruttschi, M., Kaloulis, K., McKee, T., Trumpp, A., y Beermann, F. (2005). Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res* 65, 4005-4011.
2. Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition y innate immunity. *Cell* 124:783-801.
3. Barral, P.M., Morrison, J.M., Drahos, J., Gupta, P., Sarkar, D., Fisher, P.B., y Racaniello, V.R. 2007. MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells. *J Virol* 81:3677- 3684.
4. Celada, A., Gray, P.W., Rinderknecht, E., y Schreiber, R.D. 1984. Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J Exp Med* 160:55-74.
5. Chin, L., Garraway, L.A., y Fisher, D.E. 2006. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev* 20:2149-2182.
6. Croy, B.A., y Chapeau, C. 1990. Evaluation of the pregnancy immunotrophism hypothesis by assessment of the reproductive performance of young adult mice of genotype scid/scid.bg/bg. *J Reprod Fertil* 88:231-239.
7. Denoyelle, C., Abou-Rjaily, G., Bezrookove, V., Verhaegen, M., Johnson, T.M., Fullen, D.R., Pointer, J.N., Gruber, S.B., Su, L.D., Nikiforov, M.A., *et al.* 2006. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 8:1053-1063.
8. Fecher, L.A., Cummings, S.D., Keefe, M.J., y Alani, R.M. 2007. Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol* 25:1606-1620
9. Fehrenbacher, N., y Jaattela, M. 2005. Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res* 65:2993-2995.
10. Fernandez, Y., Miller, T.P., Denoyelle, C., Esteban, J.A., Tang, W.H., Bengston, A.L., y Soengas, M.S. 2006. Chemical blockage of the proteasome inhibitory function of bortezomib: impact on tumor cell death. *J Biol Chem* 281:1107-1118.
11. Fernandez, Y., Verhaegen, M., Miller, T.P., Rush, J.L., Steiner, P., Oipari, A.W., Jr., Lowe, S.W., y Soengas, M.S. 2005. Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res* 65:6294-6304.
12. Field, A.K., Tytell, A.A., Lampson, G.P., y Hilleman, M.R. 1967. Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58:1004-1010.
13. Flaherty, K.T. 2006. Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 12:2366s-2370s.
14. Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., y Marais, R. 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445:851-857.
15. Hersey, P., y Zhang, X.D. 2008. Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 21:358-367.
16. Hippert, M.M., O'Toole, P.S., y Thorburn, A. 2006. Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res* 66:9349-9351.
17. Hoyer-Hansen, M., y Jaattela, M. 2008. Autophagy: an emerging target for cancer therapy. *Autophagy* 4:574-580.
18. Ilkovitch, D., y Lopez, D.M. 2008. Immune modulation by melanoma-derived factors. *Exp Dermatol*.
19. Ivanov.V.N., Bhoumik A y Ronai Ze'ev. 2003. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene* 22:3152-3161.
20. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., y Thun, M.J. 2008. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 58:71-96.
21. Kang, D. C., Gopalkrishnan, R. V., Lin, L., Randolph, A., Valerie, K., Pestka, S., y Fisher, P. B. (2004). Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. *Oncogene* 23, 1789-1800.
22. Kang, D.C., Gopalkrishnan, R.V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A.M., y Fisher, P.B. 2002. mda-5: An interferon-inducible putative ARN helicase with double-stranded RNAdependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:637-642.
23. Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., y Akira, S. 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6:981-988.
24. Kirkwood, J.M., Tarhini, A.A., Panelli, M.C., Moschos, S.J., Zarour, H.M., Butterfield, L.H., y Gogas, H.J. 2008. Next generation of immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol* 26:3445-3455.
25. Klionsky, D.J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D.K., Aliev, G., Askew, D.S., Baba, M., Baehrecke, E.H., Bahr, B.A., Ballabio, A., *et al.* 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4:151-175.
26. Kovacovics, M., Martinon, F., Micheau, O., Bodmer, J.L., Hofmann, K., y Tschopp, J. 2002. Overexpression of Helicard, a CARD-containing helicase cleaved during apoptosis, accelerates ADN degradation. *Curr Biol* 12:838-843.
27. Kroemer, G. y Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:1004-1010.
28. Kroemer, G., Galluzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deity, W.S., Golstein, P., Green, D.R., *et al.* (2009). Classification of cell death: recommendations for the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16:3-11.
29. Lev, D.C., Onn, A., Melinkova, V.O., Miller, C., Stone, V., Ruiz, M., McGary, E.C., Ananthaswamy, H.N., Price, J.E., y Bar-Eli, M. 2004. Exposure of melanoma cells to dacarbazine results in enhanced tumor growth and

metastasis *in vivo*. *J Clin Oncol* 22:2092-2100.

30. Lin, L., Su, Z., Lebedeva, I.V., Gupta, P., Boukerche, H., Rai, T., Barber, G.N., Dent, P., Sarkar, D., y Fisher, P.B. 2006. Activation of Ras/Raf protects cells from melanoma differentiation-associated gene-5-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 13:1982-1993.
- 5 31. Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., y Kroemer, G. 2007. Self-eating and selfkilling: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:741-752.
32. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., y Klionsky, D.J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451:1069-1075.
33. Payne, C.K. 2007. Imaging gene delivery with fluorescence microscopy. *Nanomed* 2:847-860.
- 10 34. Qin, J.Z., Xin, H., Sitailo, L.A., Denning, M.F., y Nickoloff, B.J. 2006. Enhanced killing of melanoma cells by simultaneously targeting Mcl-1 and NOXA. *Cancer Res* 66:9636-9645.
35. Qin, J.Z., Ziffra, J., Stennett, L., Bodner, B., Bonish, B.K., Chaturvedi, V., Bennett, F., Pollock, P.M., Trent, J.M., Hendrix, M.J., *et al.* 2005. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* 65:6282-6293.
- 15 36. Robinson, R.A., DeVita, V.T., Levy, H.B., Baron, S., Hubbard, S.P., y Levine, A.S. 1976. A phase I-II trial of multiple-dose polyribonucleoside-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 57:599-602.
37. Schatton, T., Murphy, G.F., Frank, N.Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L.M., Weishaupt, C., *et al.* 2008. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451:345-349.
- 20 38. Soengas, M.S., y Lowe, S.W. 2003. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22:3138-3151.
39. Soengas, M.S., Capodiceci, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J.G., Gerald, W.L., Lazebnik, Y.A., *et al.* 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409:207-211.
- 25 40. Soengas, M.S., Gerald, W.L., Cordon-Cardo, C., Lazebnik, Y., y Lowe, S.W. 2006. Apaf-1 expression in malignant melanoma. *Cell Death Differ* 13:352-353.
41. Tawbi, H.A., y Kirkwood, J.M. 2007. Management of metastatic melanoma. *Semin Oncol* 34:532-545.
- 30 42. Tormo, D., Ferrer, A., Bosch, P., Gaffal, E., Basner-Tschakarjan, E., Wenzel, J. y Tuting, T. 2006. Therapeutic efficacy of antigen-specific vaccination and toll-like receptor stimulation against established transplanted and autochthonous melanoma in mice. *Cancer Res* 66:5427-5435.
43. Verma, S., Petrella, T., Hamm, C., Bak, K., y Charette, M. 2008. Biochemotherapy for the treatment of metastatic malignant melanoma: a clinical practice guideline. *Curr Oncol* 15:85-89.
44. Wenzel, J., Tormo, D., y Tuting, T. 2008. Toll-like receptor-agonists in the treatment of skin cancer: history, current developments and future prospects. *Handb Exp Pharmacol*: 201-220.
- 35 45. Wilcox, R., y Markovic, S.N. 2007. Tumor immunotherapy in melanoma: on the dawn of a new era? *Curr Opin Mol Ther* 9:70-78.
46. Wolter, K.G., Verhaegen, M., Fernandez, Y., Nikolovska-Coleska, Z., Riblett, M., de la Vega, C.M., Wang, S., y Soengas, M.S. 2007. Therapeutic window for melanoma treatment provided by selective effects of the proteasome on Bcl-2 proteins. *Cell Death Differ* 14:1605-1616.
- 40 47. Xie, Z., y Klionsky, D.J. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9:1102-1109.
48. Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Akira, S., *et al.* 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 175:2851-2858.
- 45

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundación Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas Carlos III.

5 <120> Process for the identification of compounds for treating cancer.

<130> PCT-03837

<160> 3

10 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

15 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

20 <221> característica_misc

<222> (1)..(21)

<223> Secuencia diana de shRNA utilizada para regular a la baja el gen MDA-5.

<400> 1

25 cgcaaggagt tccaaccatt t 21

<210> 2

<211> 19

30 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

35 <223> Cebador directo de RT-PCR para detectar la expresión del gen MDA-5.

<400> 2

ggcaccatgg gaagtgatt 19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

45 <220>

<223> Cebador inverso de RT-PCR para detectar la expresión del gen MDA-5.

<400> 3

50 atttgtaag gcctgagctg 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para la identificación de compuestos para su uso como agentes terapéuticos para tratar cáncer que comprende las etapas de:
- 10 a) Poner en contacto el compuesto candidato con un cultivo de células cancerosas o línea celular cancerosa derivada de células cancerosas;
 - 15 b) Determinar el nivel de activación de una MDA-5 de la familia de las helicasas o el nivel de expresión de NOXA, en combinación con la determinación de la inducción de autofagia en células cancerosas o en una línea celular cancerosa derivada de células cancerosas;
 - c) Comparar los datos obtenidos en la etapa b) con los observados en el control de las mismas células tratadas de forma similar, pero en ausencia del compuesto candidato;
 - d) Seleccionar los compuestos que han dado lugar a un aumento significativo del parámetro o parámetros determinados en la etapa b) en comparación con el control.
- 20 2. El proceso, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la determinación de la inducción de autofagia se realiza comprobando el nivel de expresión, la presencia de modificaciones postraduccionales o la localización intracelular de una proteína de autofagia.
3. El proceso, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la inducción de autofagia se determina por una técnica seleccionada del grupo:
- 25 i. Cambio de movilidad electroforética de la proteína LC3, o
 - ii. Detección de la formación de focos de la proteína LC3.
4. El proceso, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la inducción de autofagia se determina comprobando la presencia de autofagosomas por observación microscópica de los mismos.
- 30 5. El proceso, de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la presencia de autofagosomas se comprueba usando microscopia electrónica de transmisión.
6. El proceso, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se determinan el nivel de activación de MDA-5, el nivel de expresión de NOXA y la inducción de autofagia.
- 35 7. El proceso, de acuerdo con la reivindicación 1, para la identificación de compuestos para su uso como agentes terapéuticos para tratar melanoma que comprende las etapas de:
- 40 a) Poner en contacto el compuesto candidato con un cultivo de células de melanoma, o una línea celular derivada de células de melanoma;
 - b) Determinar el nivel de activación de una MDA-5 de la familia de las helicasas o el nivel de expresión de NOXA, en combinación con la determinación de la inducción de autofagia en células cancerosas o en una línea celular cancerosa derivada de células cancerosas;
 - 45 c) Comparar los datos obtenidos en la etapa b) con los observados en el control de las mismas células tratadas de forma similar, pero en ausencia del compuesto candidato;
 - d) Seleccionar los compuestos que han dado lugar a un aumento significativo del parámetro o parámetros determinados en la etapa b) en comparación con el control.
- 50 8. El proceso, de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la línea celular se selecciona del grupo de líneas celulares humanas: SK-Mel-19, SK-Mel-28, SK-Mel-103 y SK-Mel-147, y células de ratón B16.
9. El proceso, de acuerdo con la reivindicación 1, para la identificación de compuestos para su uso como agentes terapéuticos para tratar al menos uno de los siguientes tipos de cáncer: carcinoma de páncreas, colon, vejiga, mama, próstata, pulmón y ovario que comprende las etapas de:
- 55 a) Poner en contacto el compuesto candidato con un cultivo de células cancerosas de al menos uno de los tipos de cáncer anteriormente mencionados o una línea celular derivada de al menos uno de los tipos de cáncer anteriormente mencionados;
 - 60 b) Determinar el nivel de activación de una MDA-5 de la familia de las helicasas o el nivel de expresión de NOXA, en combinación con la determinación de la inducción de autofagia en células cancerosas o en una línea celular cancerosa derivada de células cancerosas;
 - c) Comparar los datos obtenidos en la etapa b) con los observados en el control de las mismas células tratadas de forma similar, pero en ausencia del compuesto candidato;
 - 65 d) Seleccionar los compuestos que han dado lugar a un aumento significativo del parámetro o parámetros determinados en la etapa b) en comparación con el control.

- 5 10. El proceso, de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la línea celular se selecciona del grupo de líneas celulares de cáncer de páncreas: IMIMPC2, MiaPaCa2, Aspc1, A6L, SKPC1 y Panc-1; o del grupo de líneas celulares de cáncer de colon: CACO, SW480 y SW1222; o del grupo de líneas celulares de cáncer de vejiga: RT112, MGHU4, 639V, 253J, MGHu3 y SW1170; o del grupo de líneas celulares de glioma: U87MG, U251 y T98G; o del grupo de líneas celulares de cáncer de mama: MDA231, MCF7 y T47D; o del grupo de líneas celulares de cáncer de próstata: LNCaP, PC3 y DU145; o del grupo de líneas celulares de cáncer de pulmón: H1299 y NCI H460; o del grupo de líneas celulares de cáncer de ovario: NCI H23, CHQK1 y SK-OV-3.
- 10 11. El proceso, de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, en el que el compuesto seleccionado consiste en una combinación de ARN bicatenario, (ARNbc) que contiene al menos 1000 nucleótidos de longitud por cadena y un policatión.
- 15 12. El proceso, de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el compuesto seleccionado consiste en una combinación de ácido poliinosin-policitidílico (pIC) que contiene al menos 1000 nucleótidos de longitud por cadena y polietilenimina (PEI).
- 20 13. Compuesto que consiste en una combinación de ácido poliinosin-policitidílico (pIC) que contiene al menos 1000 nucleótidos de longitud por cadena y polietilenimina (PEI) para su uso como medicamento.
- 25 14. Compuesto, de acuerdo con la reivindicación 13, que consiste en una combinación de ácido poliinosin-policitidílico (pIC) que contiene al menos 1000 nucleótidos de longitud por cadena y polietilenimina (PEI) para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 30 15. Composición farmacéutica que comprende el compuesto de las reivindicaciones 13 ó 14 para su uso como medicamento.
- 35 16. Composición farmacéutica que comprende el compuesto de las reivindicaciones 13 ó 14, de acuerdo con la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento de cáncer.
17. Composición farmacéutica, de acuerdo con la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento de un tipo de cáncer caracterizado por presentar activación de una MDA-5 de la familia de las helicasas o la expresión de NOXA, en combinación con biomarcadores relacionados con la inducción de autofagia.
18. Composición farmacéutica, de acuerdo con la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento de melanoma.
19. Composición farmacéutica, de acuerdo con la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento de al menos uno de los siguientes tipos de cáncer: carcinoma de páncreas, colon, vejiga, mama, próstata, pulmón y ovario.

FIGURA 1

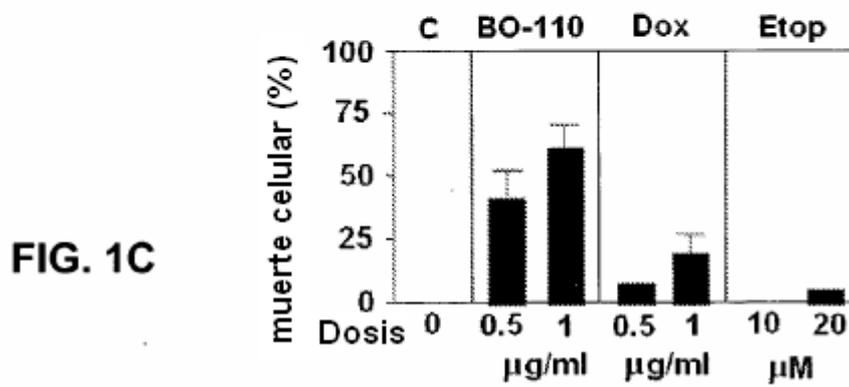
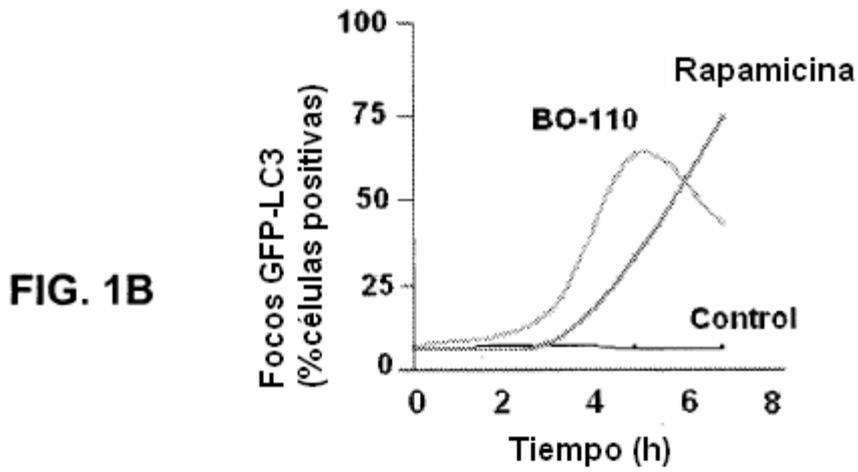
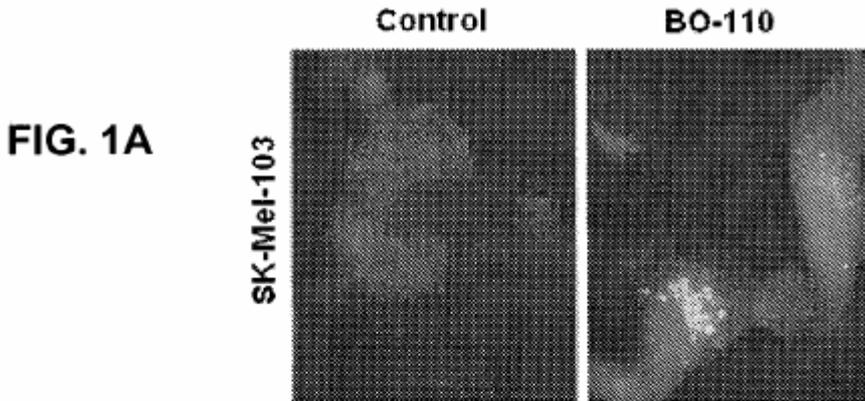


FIGURA 1 (Cont.)

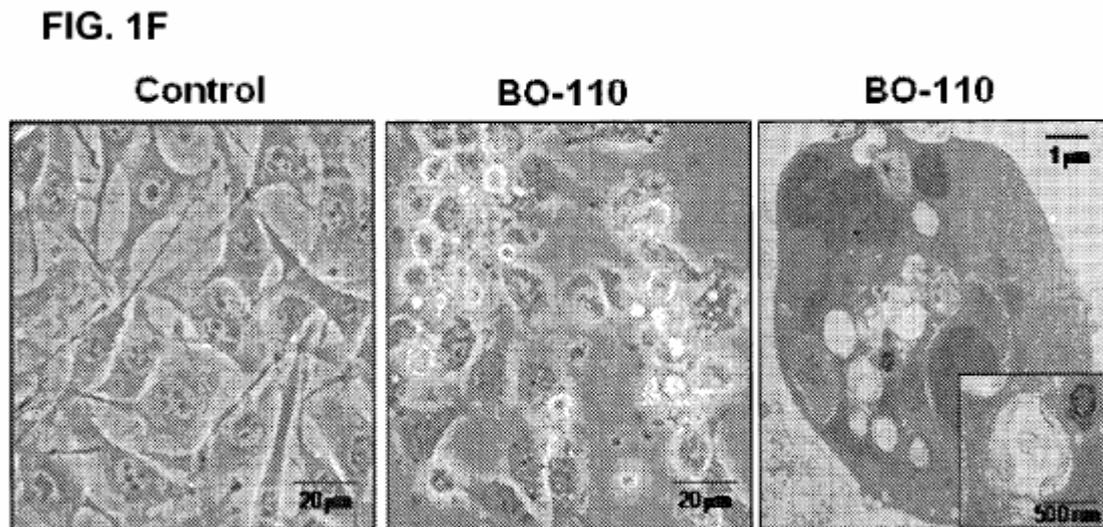
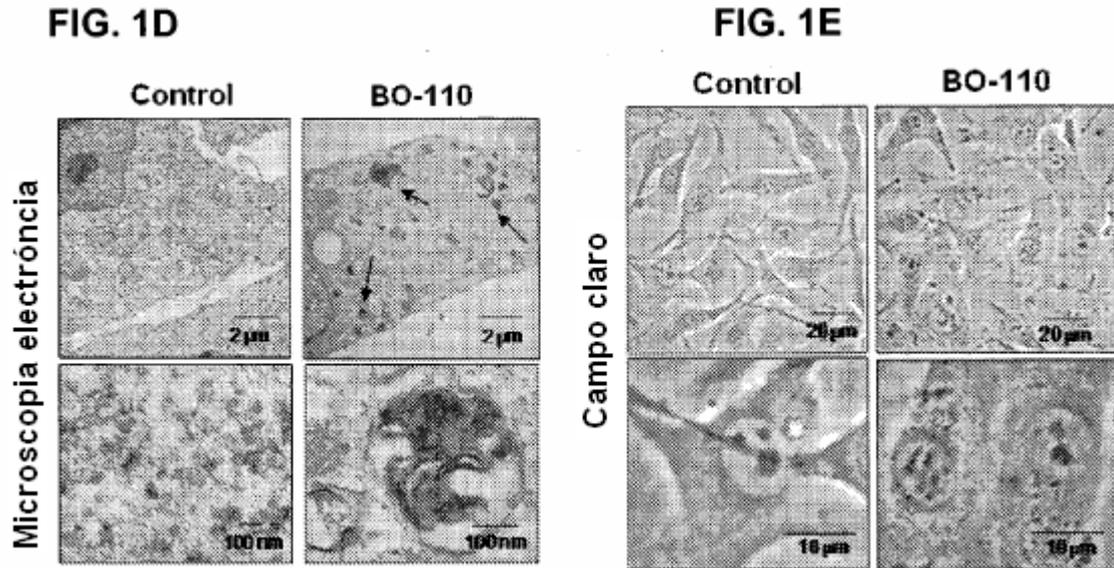
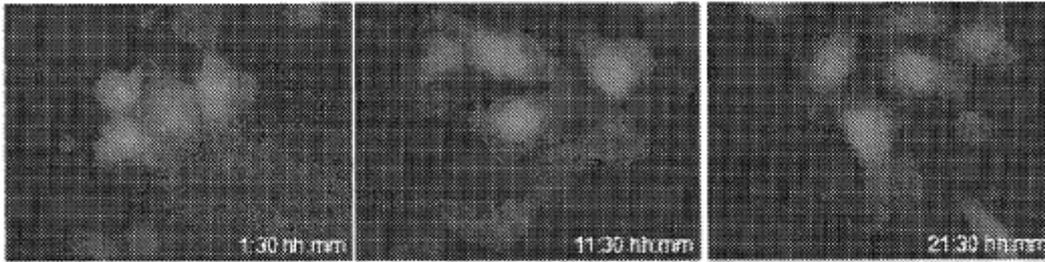


FIGURA 2

Control



BO-110

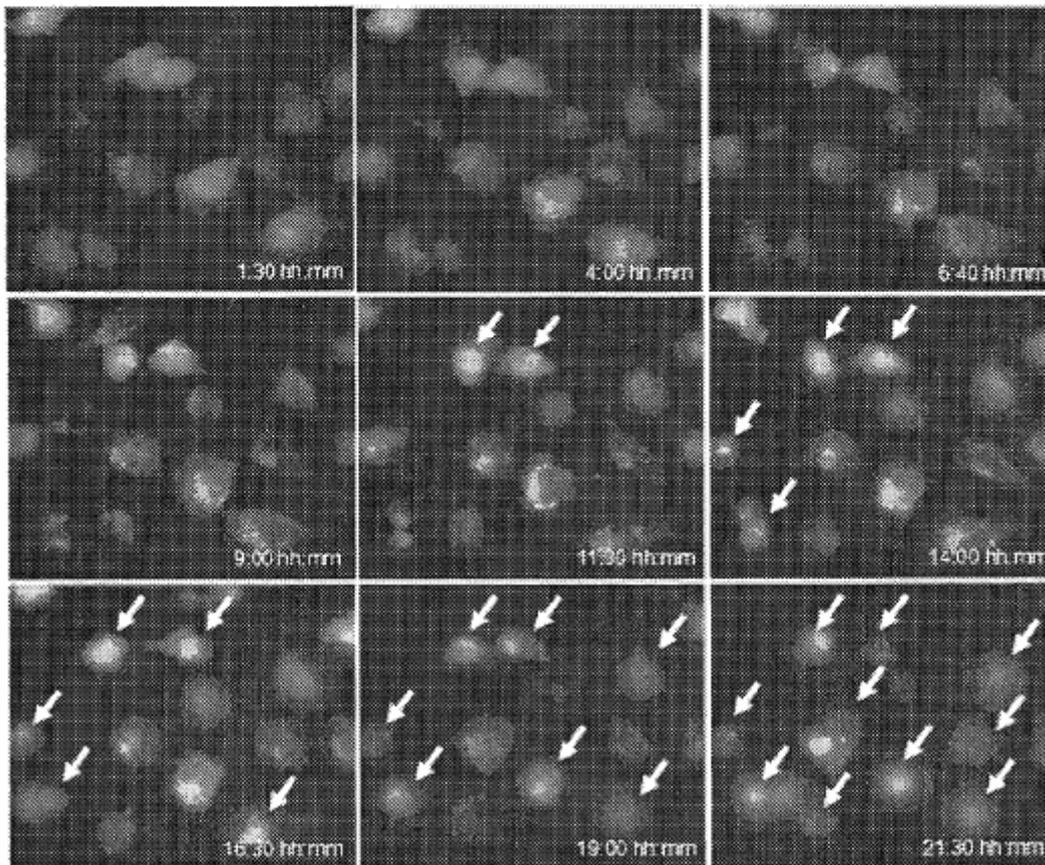


FIGURA 3

FIG. 3A

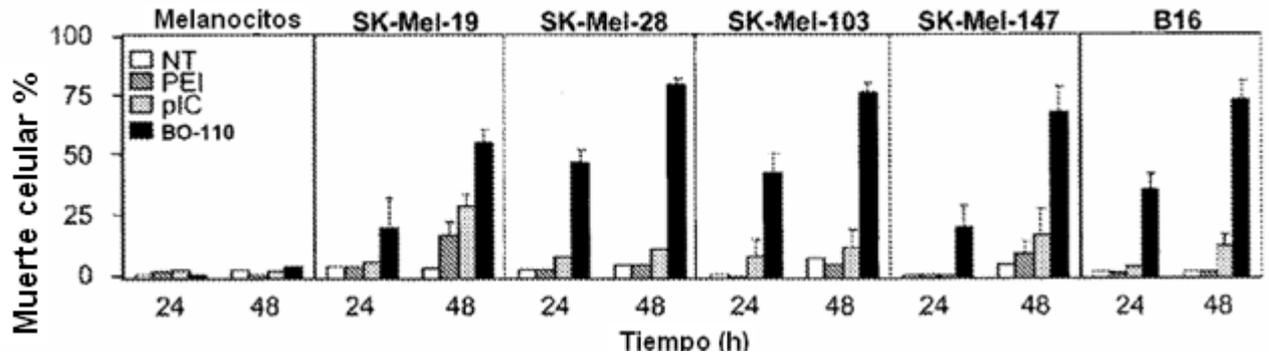


FIG. 3B

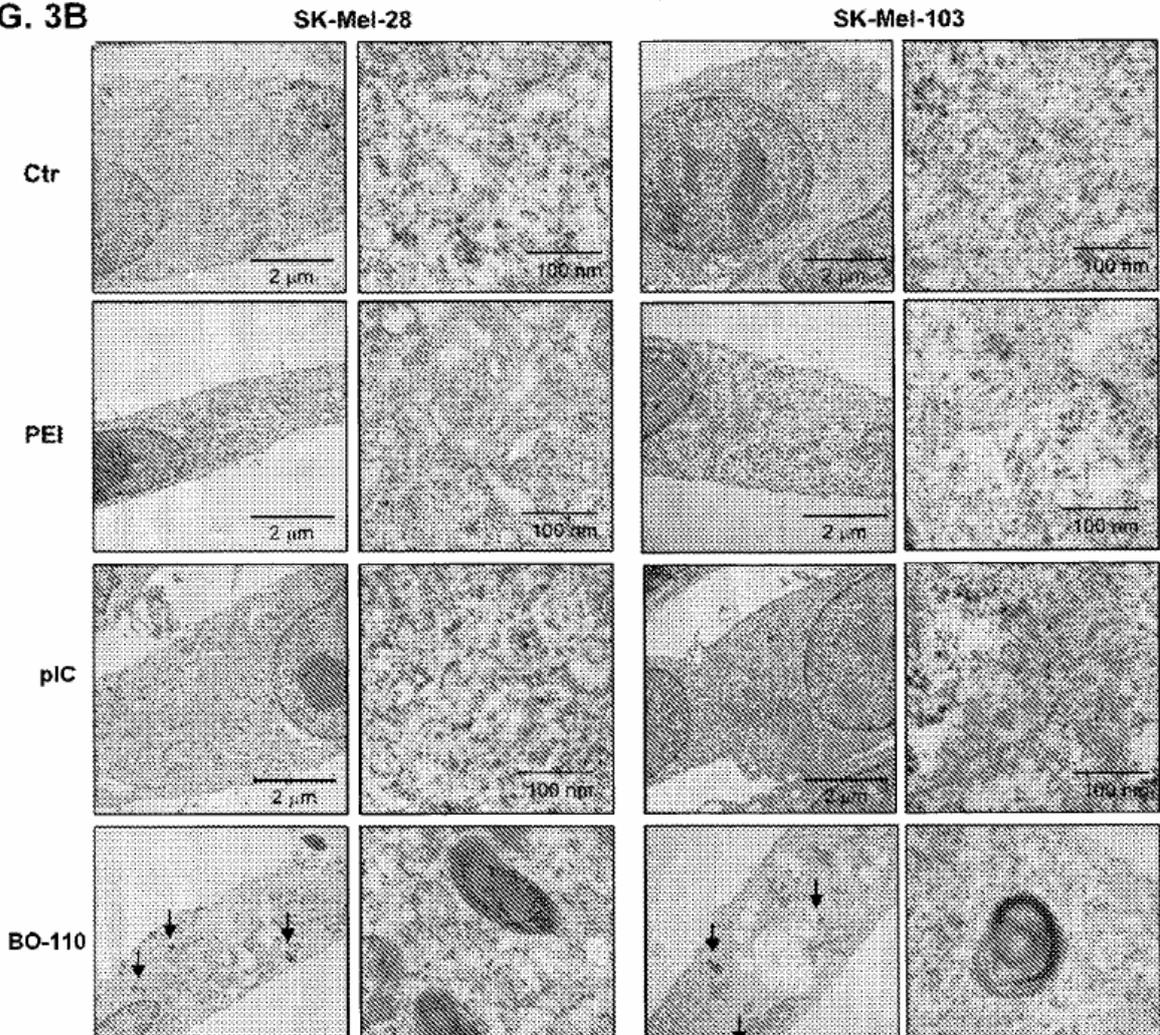


FIGURA 4

FIG. 4A

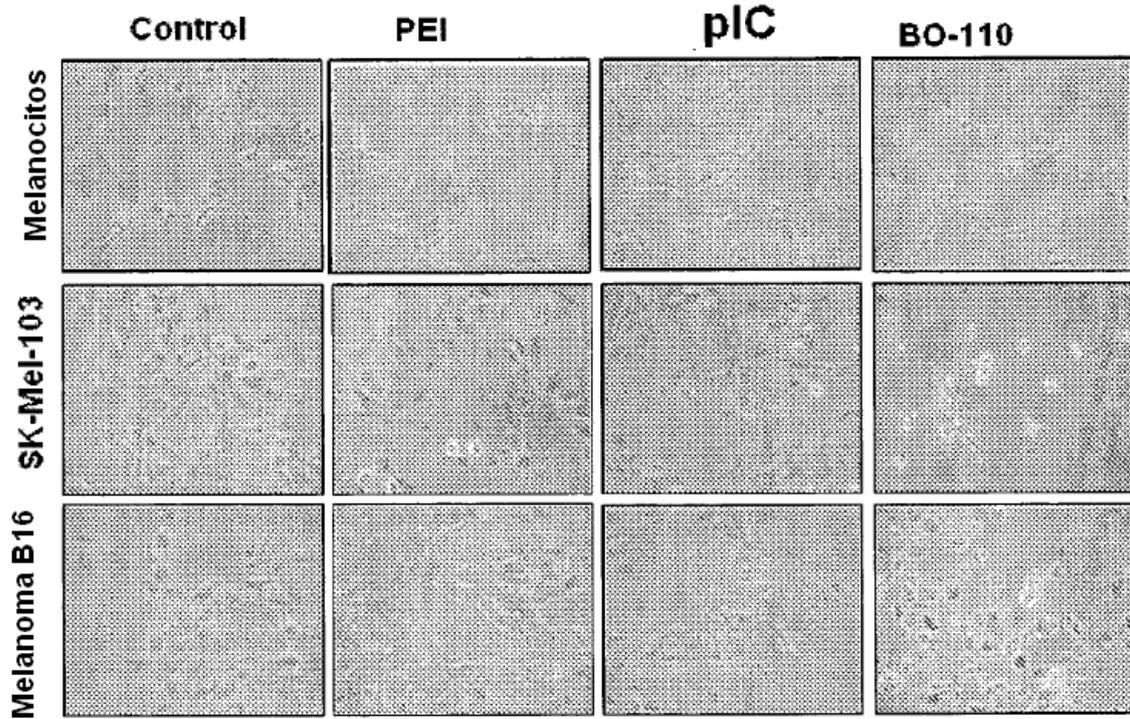


FIG. 4B

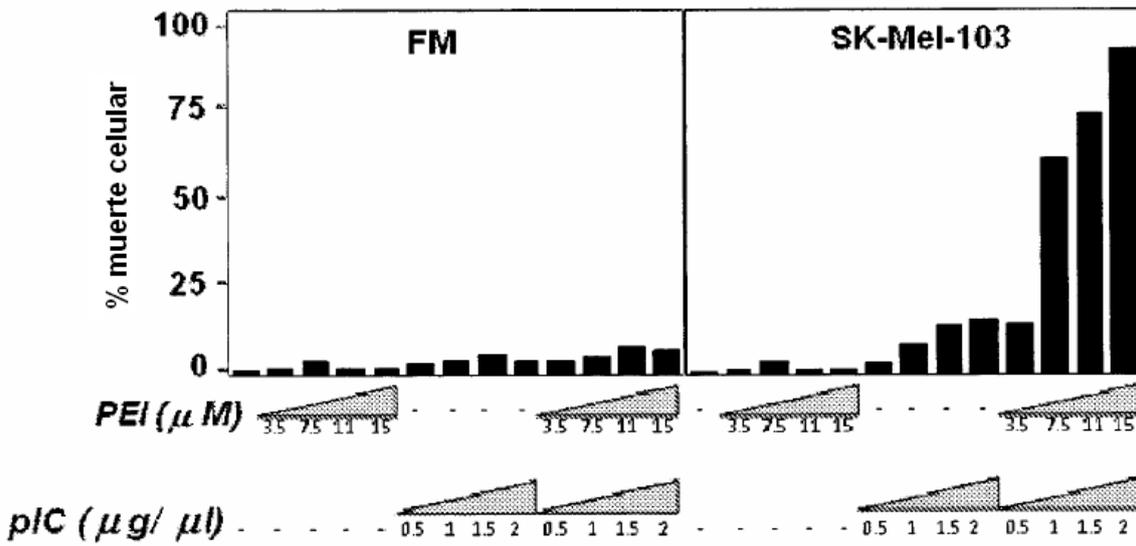


FIGURA 4C (Cont.)

FIG. 4C

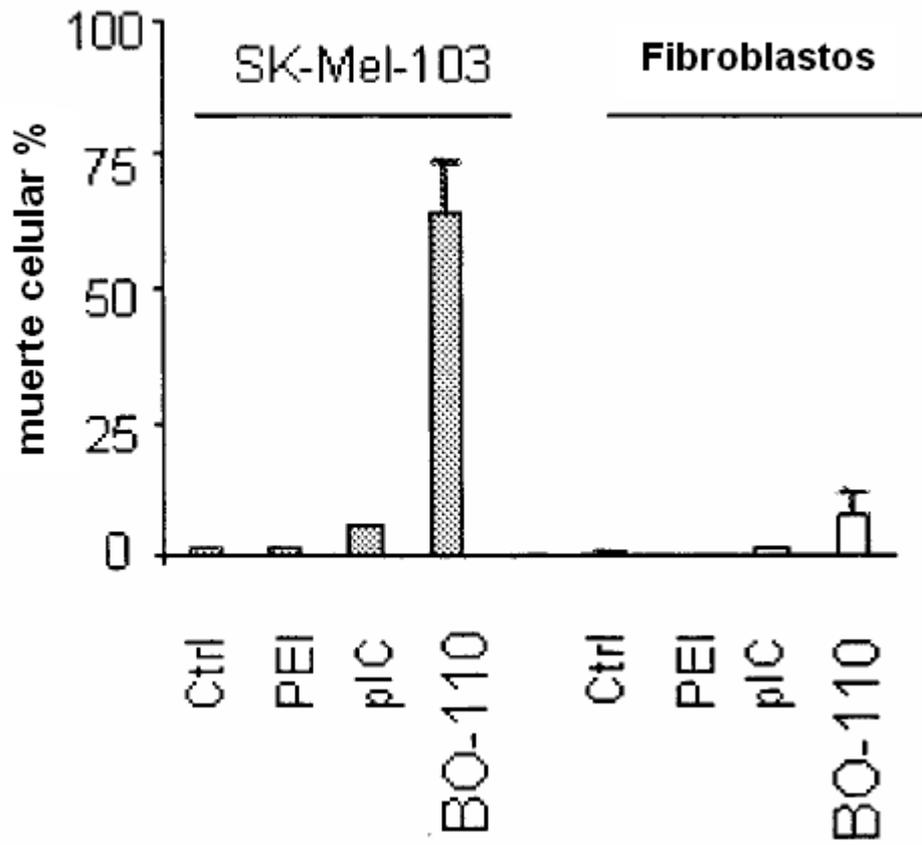


FIGURA 5

FIG. 5A

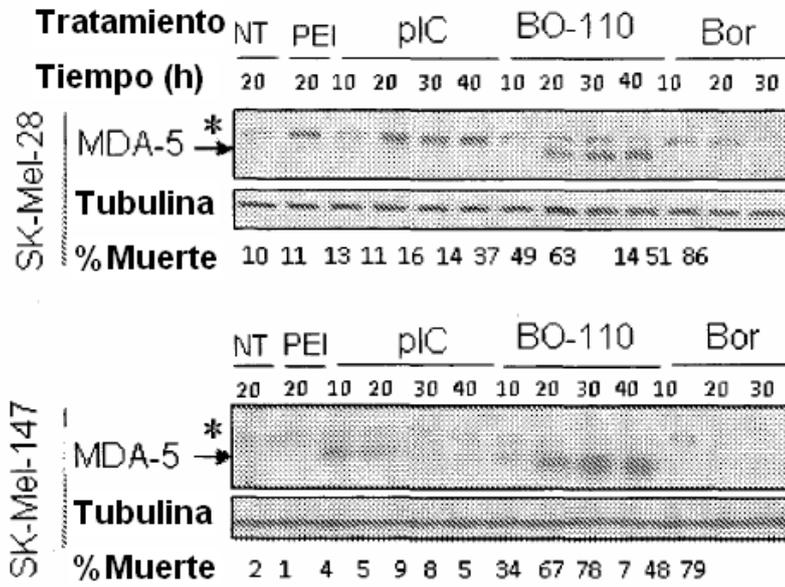


FIG. 5B

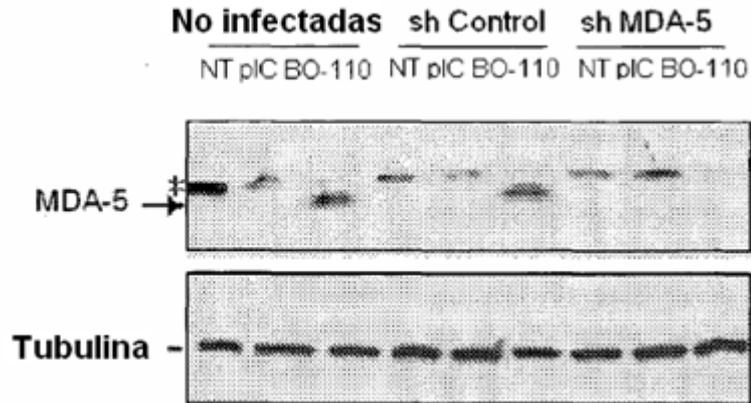


FIG. 5C

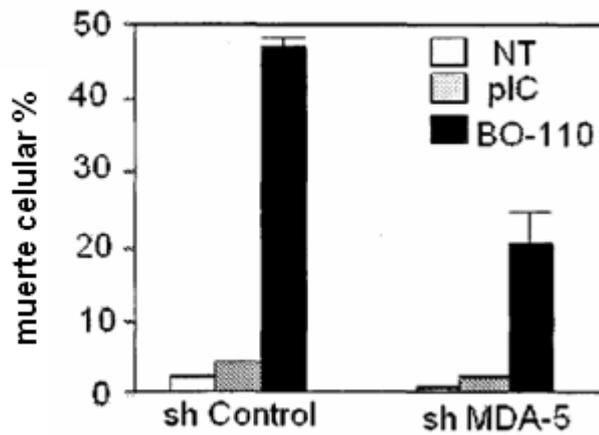


FIGURA 6

FIG. 6A

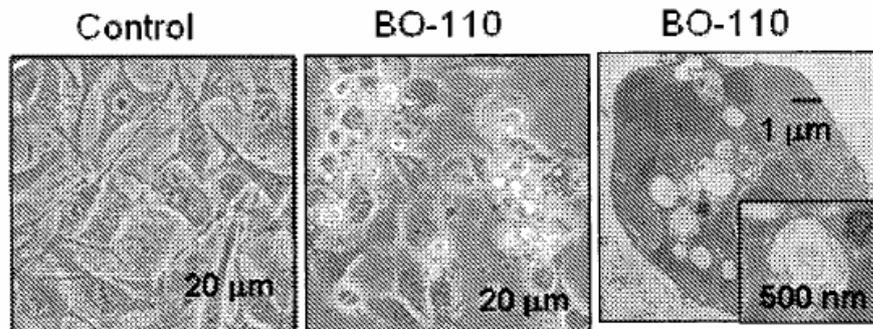


FIG. 6B

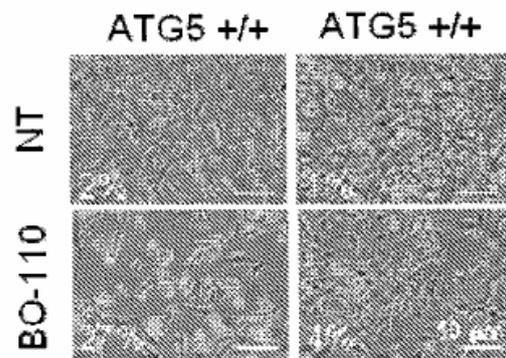
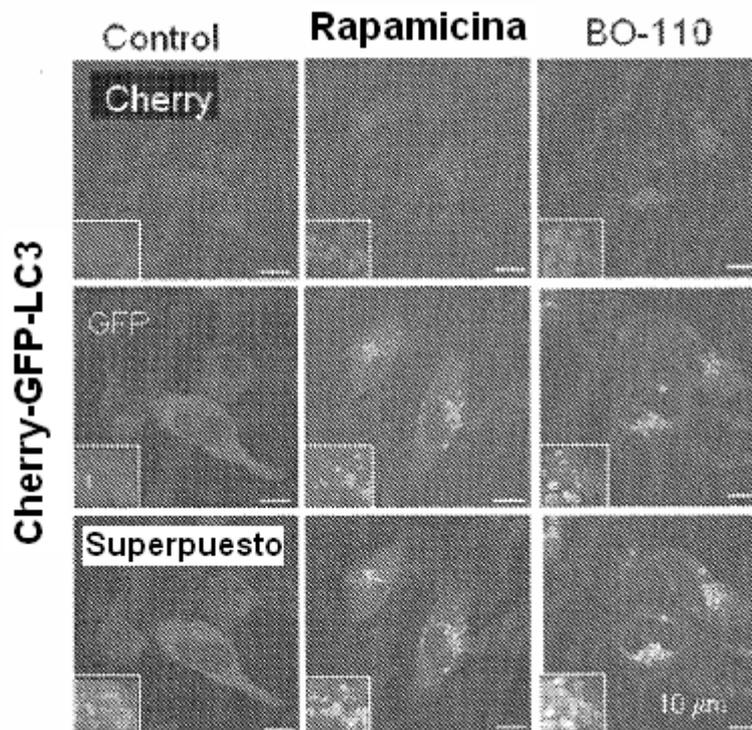


FIG. 6C



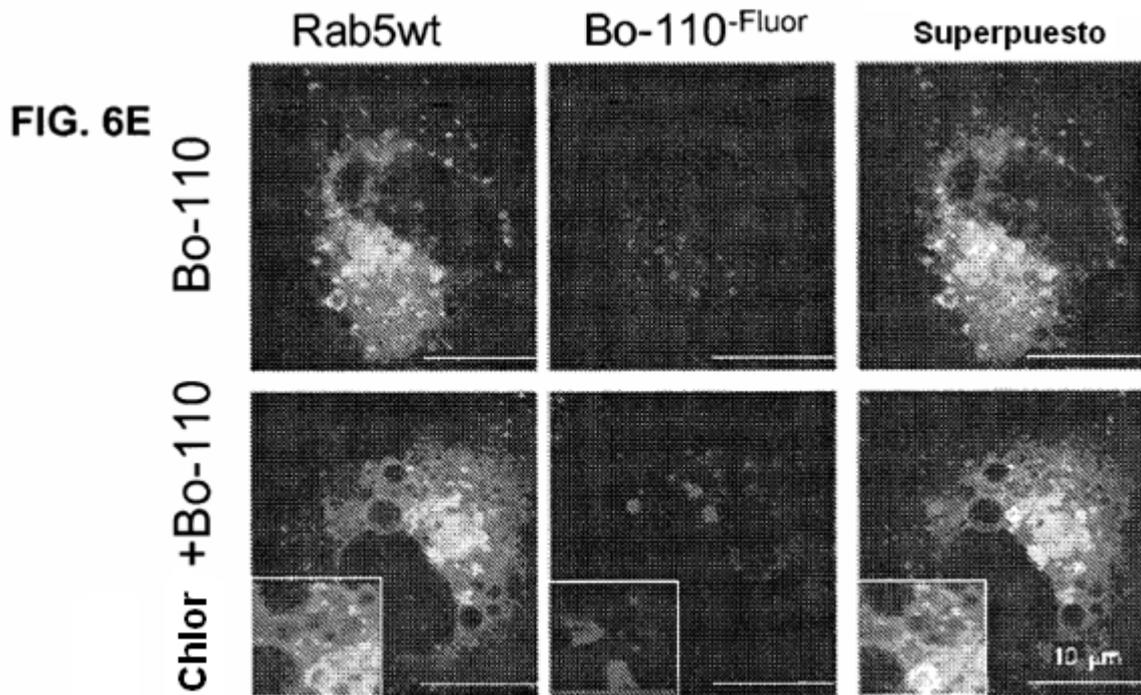
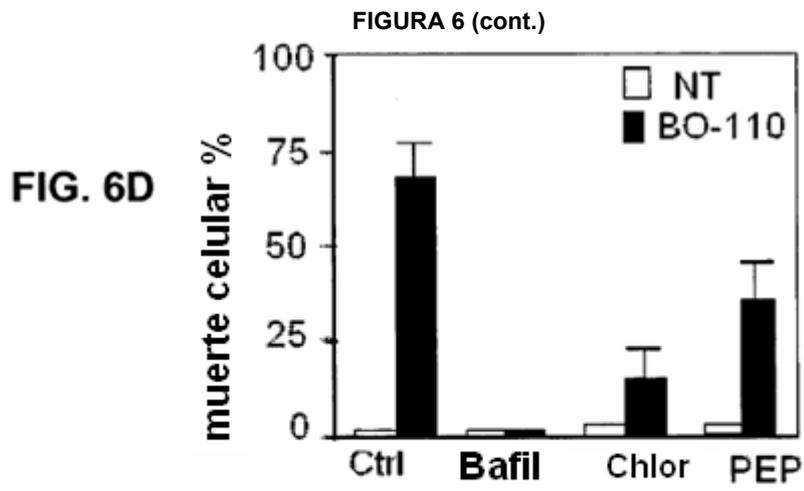


FIGURA 6 (cont.)

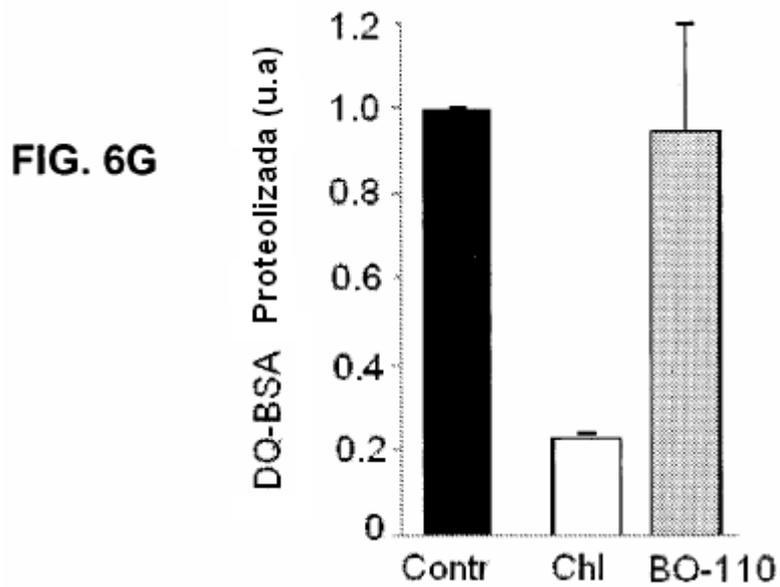
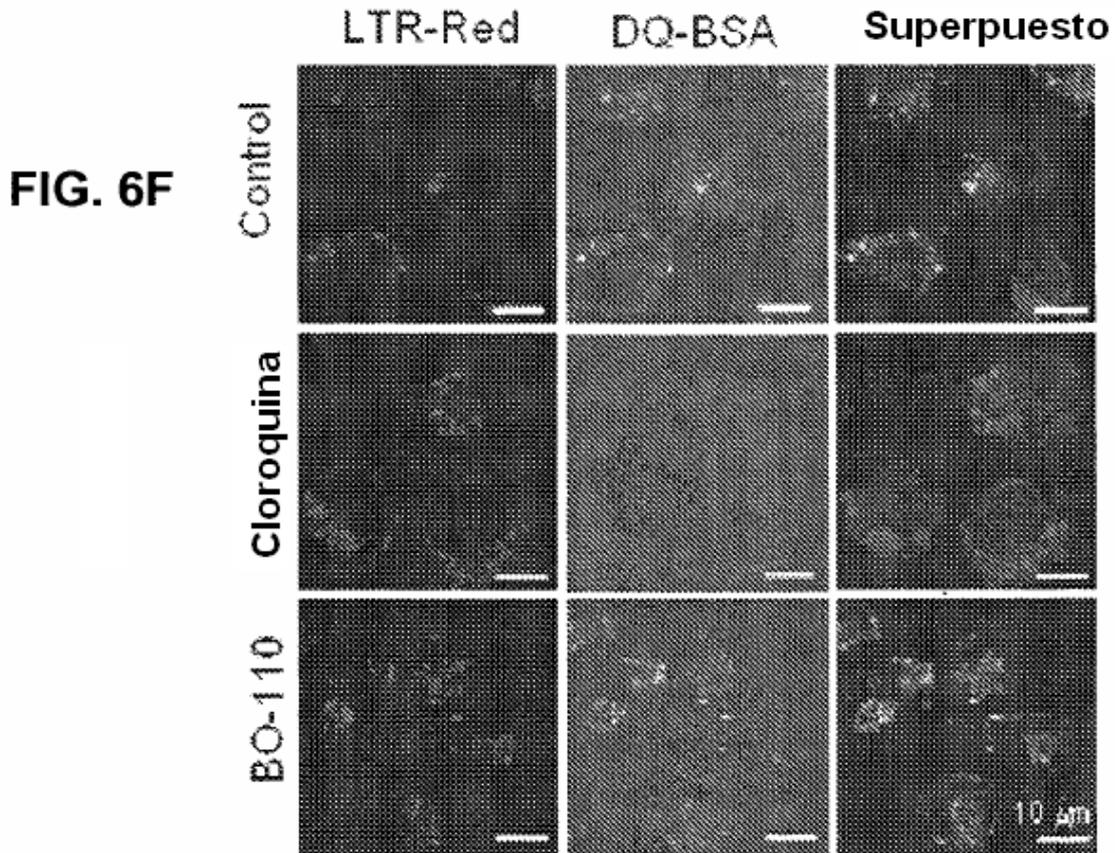


FIGURA 6 (cont.)

FIG. 6H

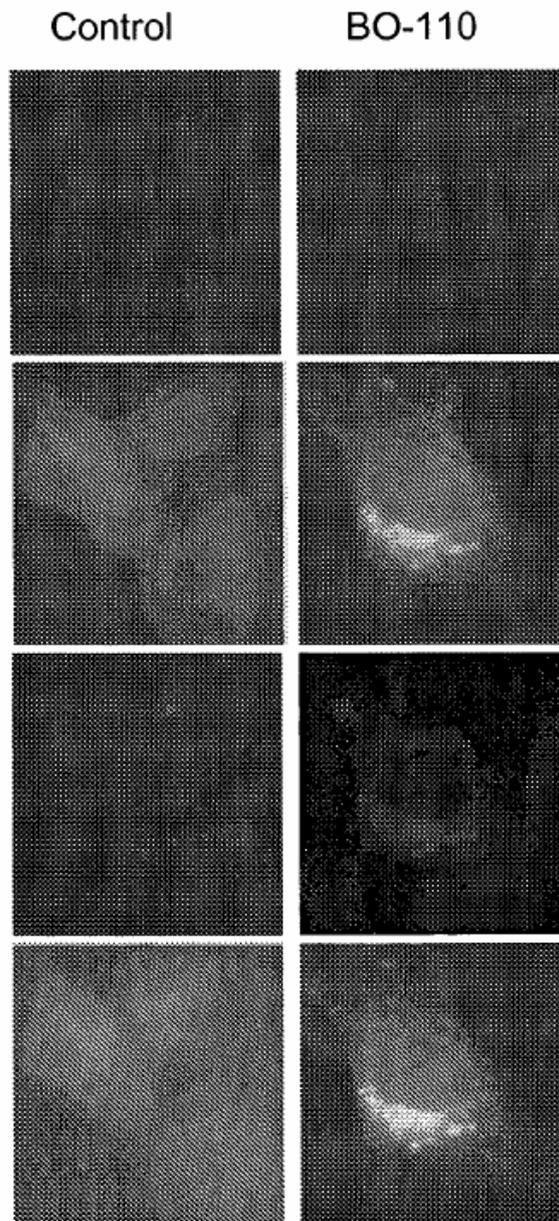


FIGURA 6 (cont.)

FIG. 6I

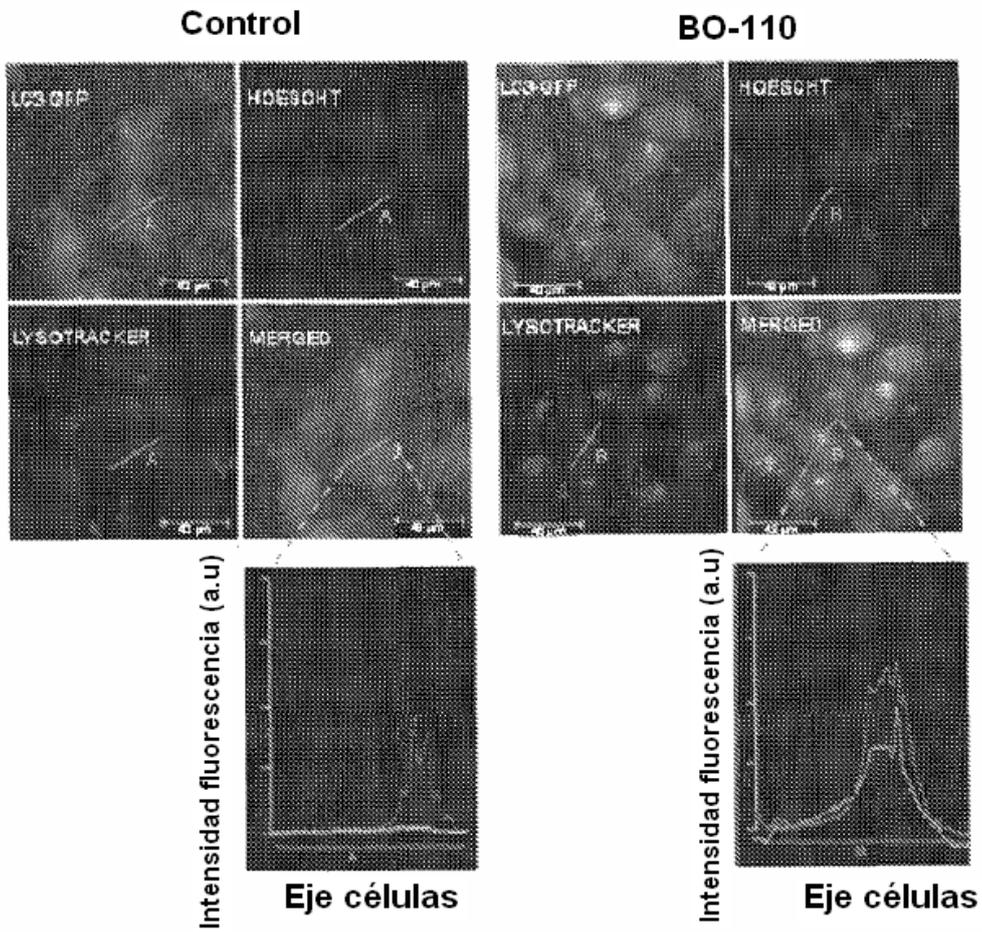


FIG. 6J

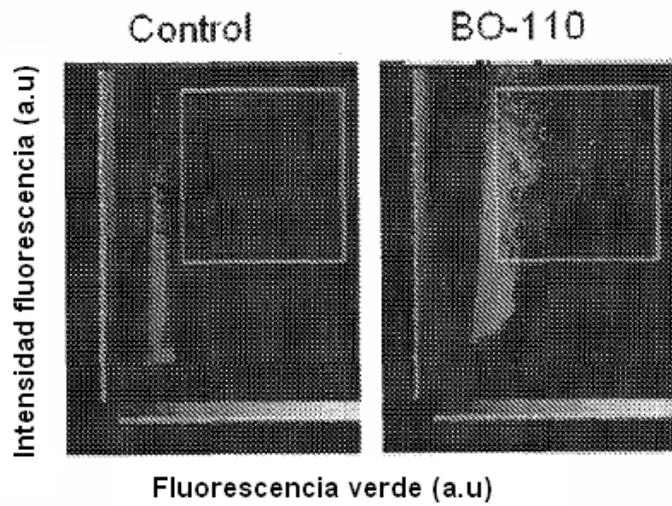


FIGURA 7

FIG. 7A

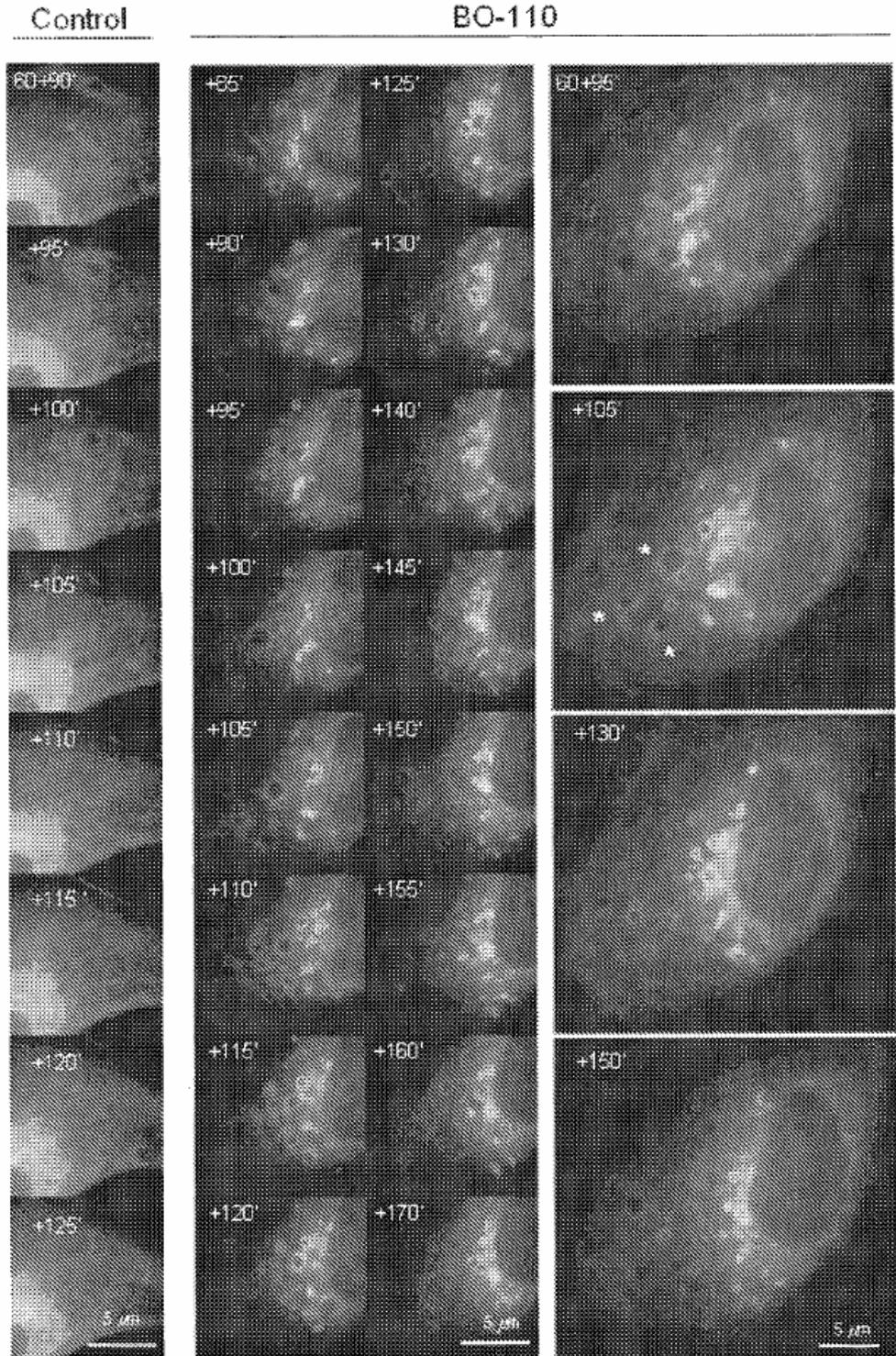


FIGURA 7 (CONT.)

FIG. 7B

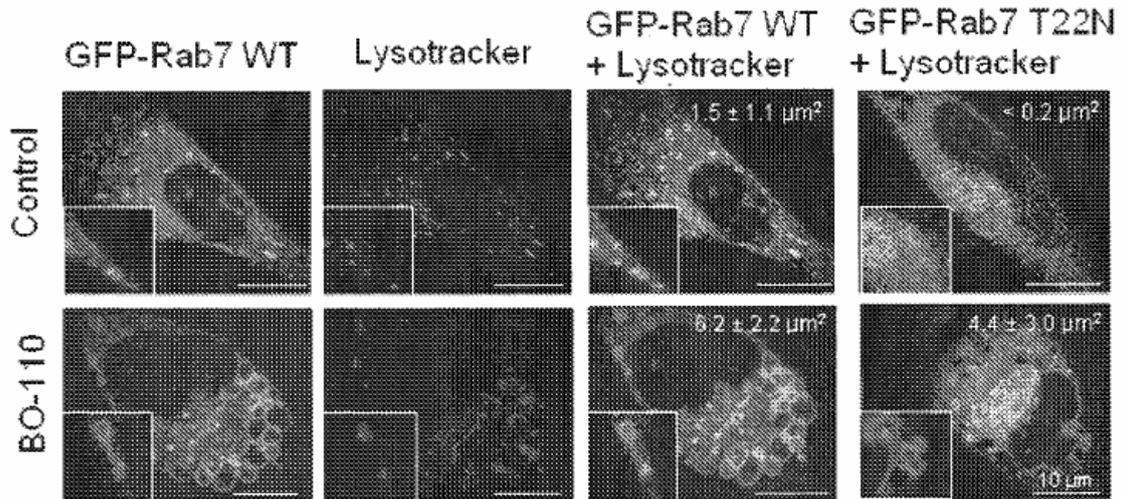


FIG. 7C

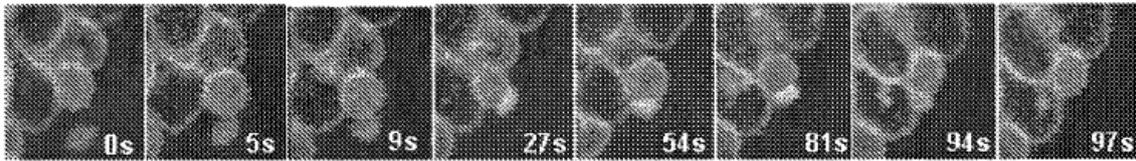


FIG. 7D

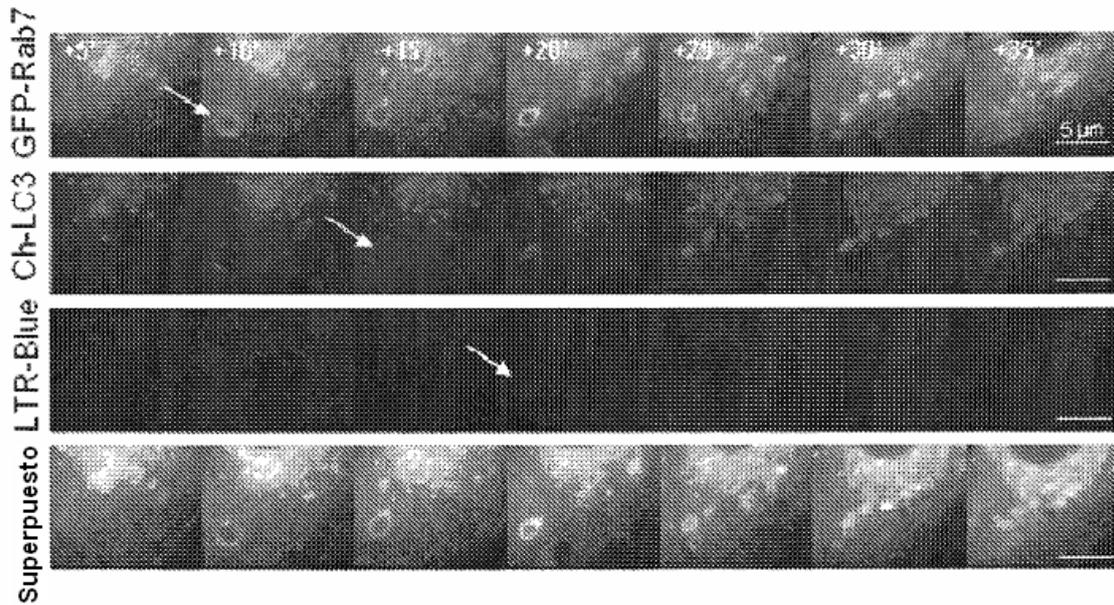


FIGURE 7 (Cont.)

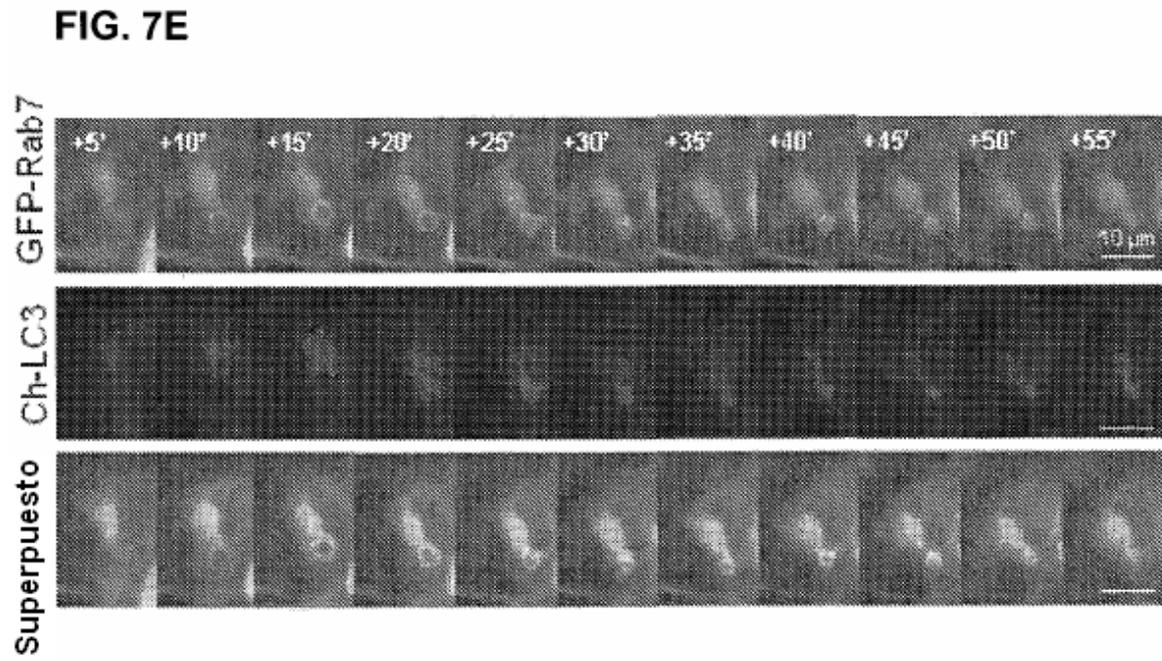


FIGURA 8

FIG. 8A

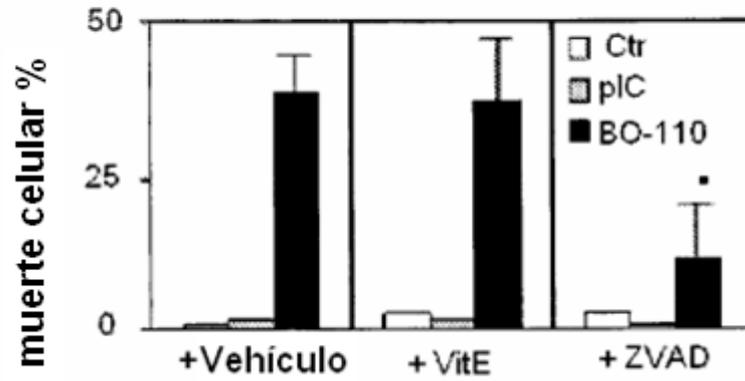


FIG. 8B

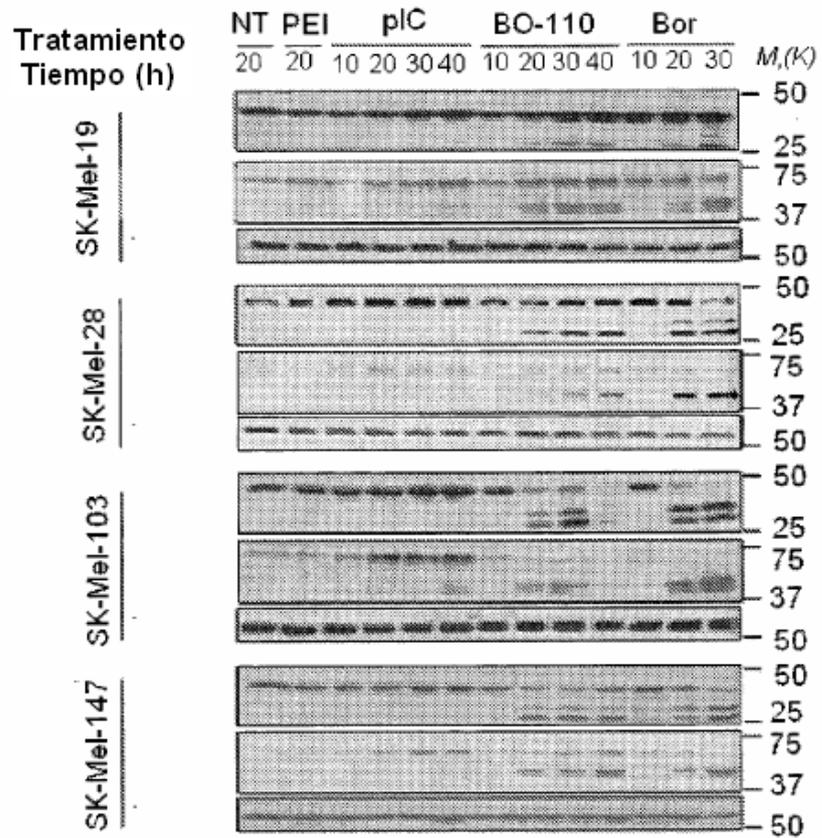


FIGURA 8 (cont.)

FIG. 8C

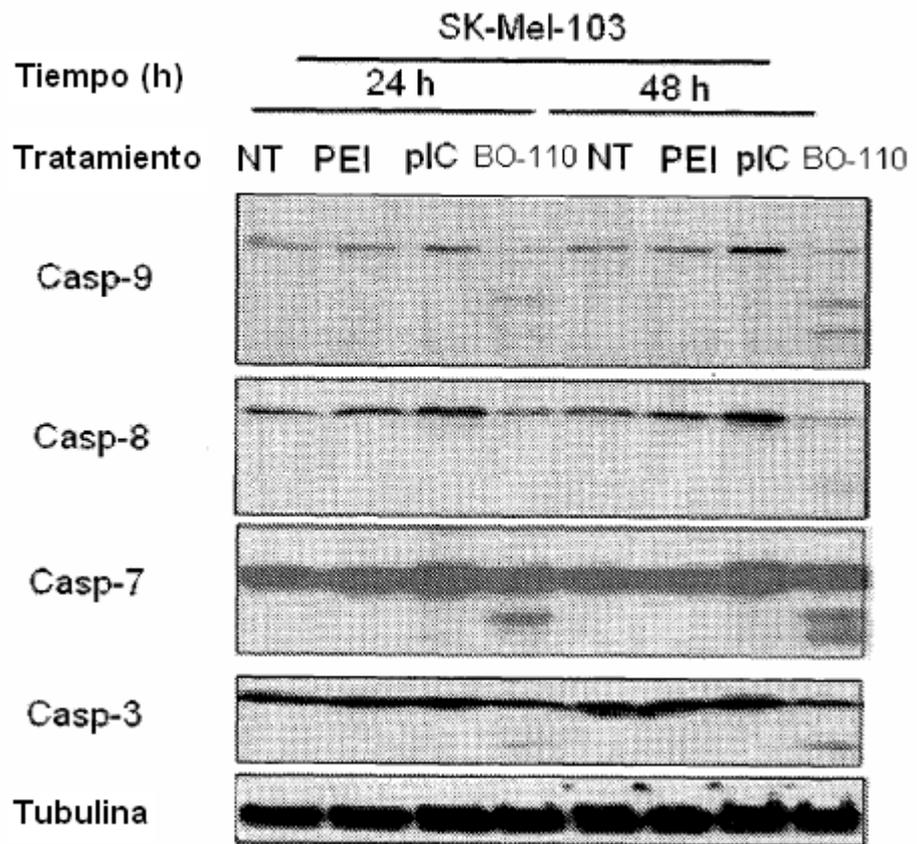


FIGURA 9

FIG. 9A

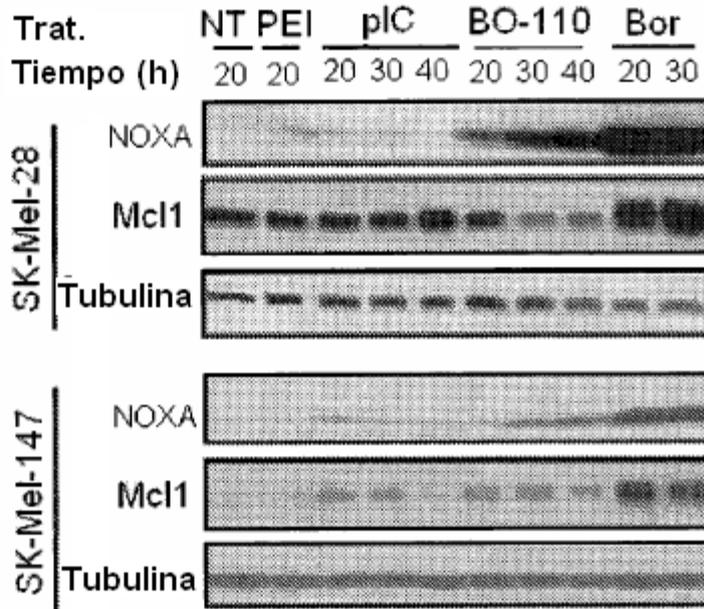


FIG. 9B

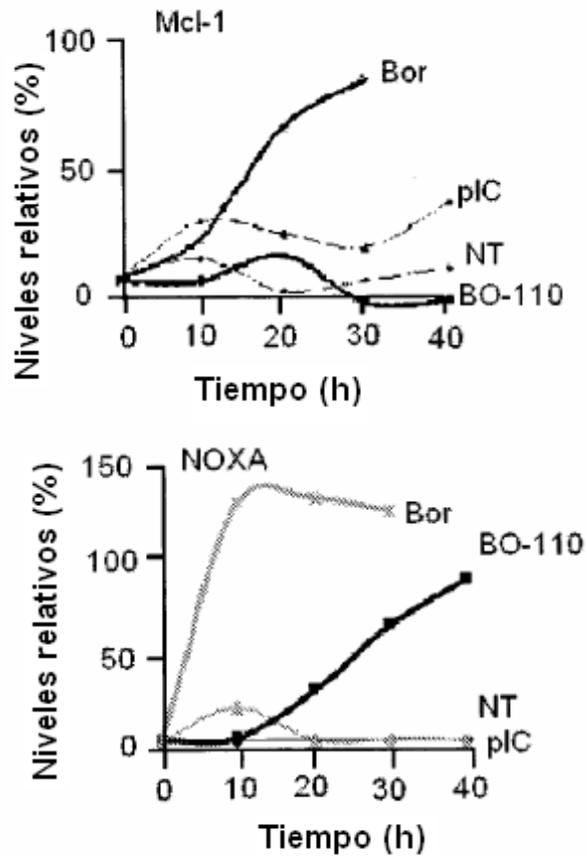


FIGURA 9 (cont.)

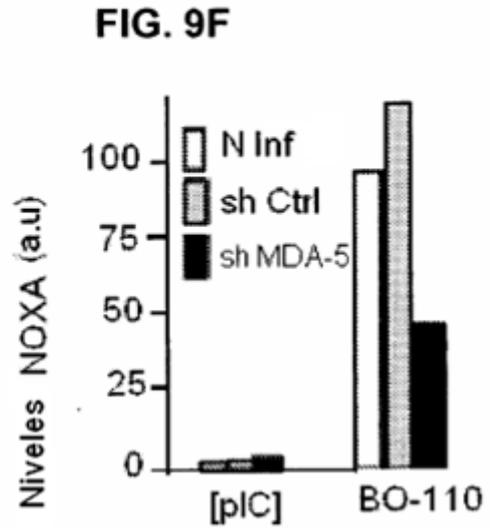
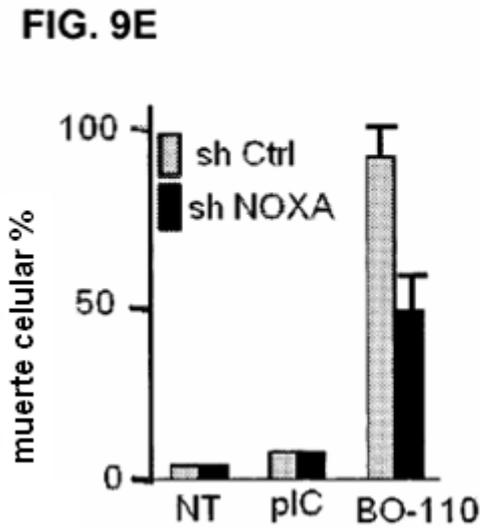
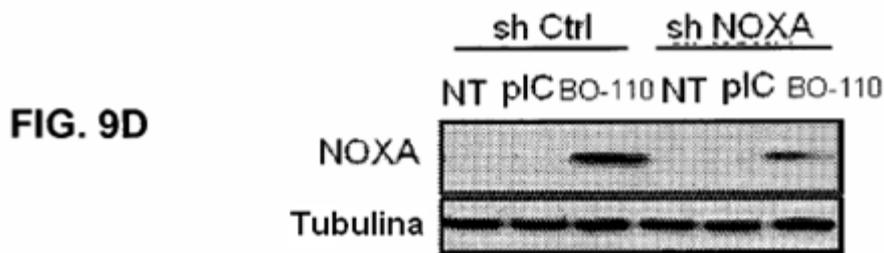
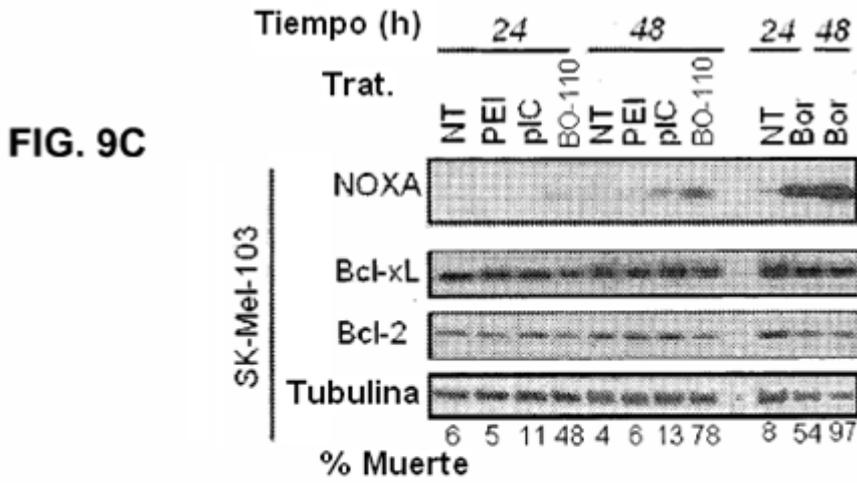


FIGURA 10

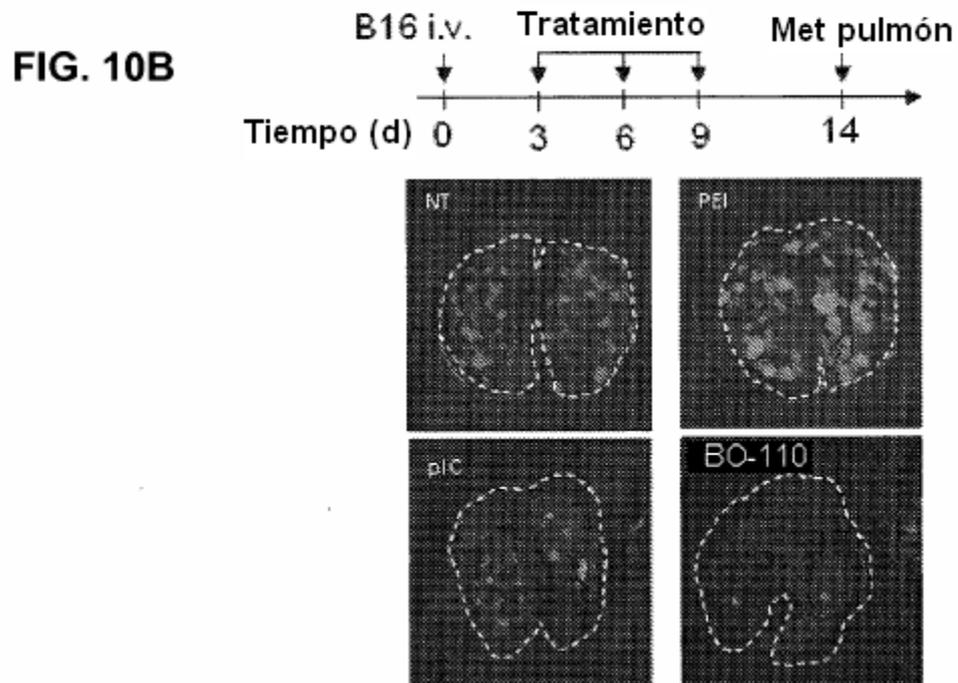
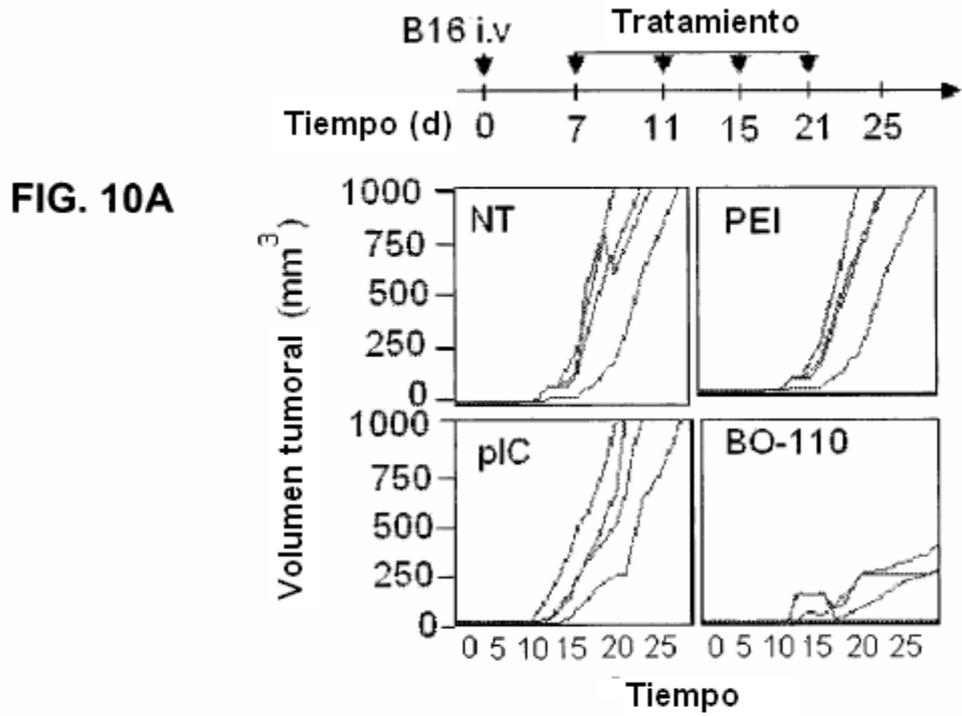


FIGURA 10 (cont.)

FIG. 10C

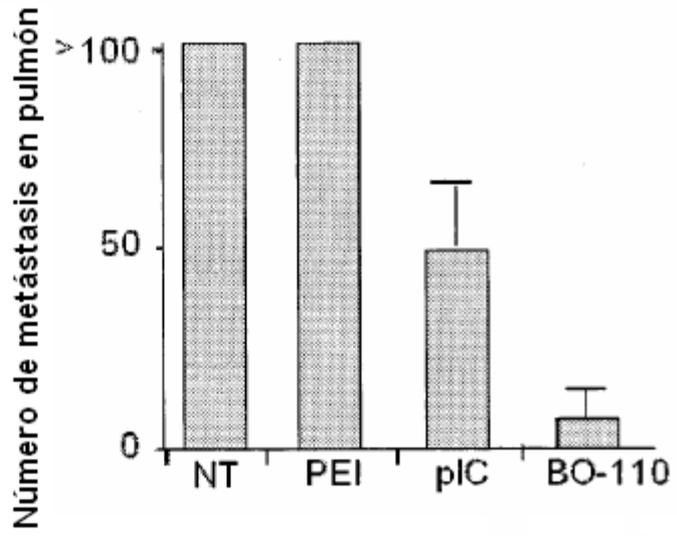


FIGURA 11

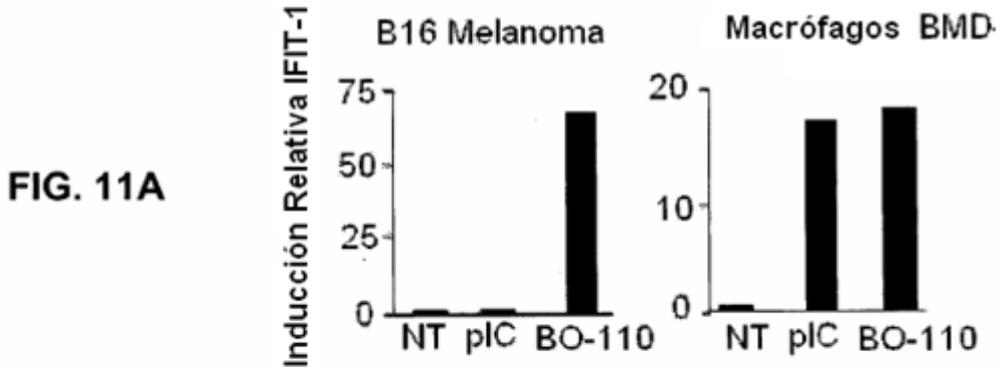


FIG. 11B

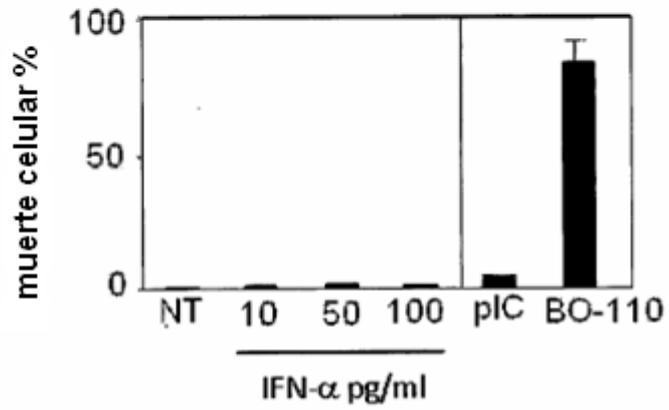


FIG. 11C

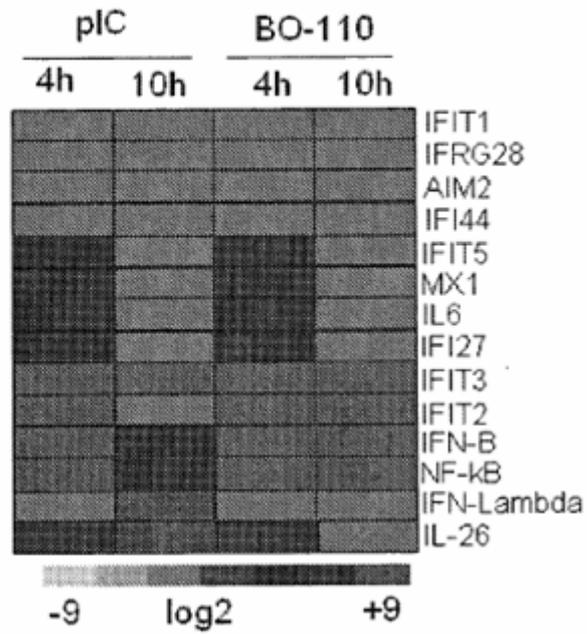


FIGURA 12

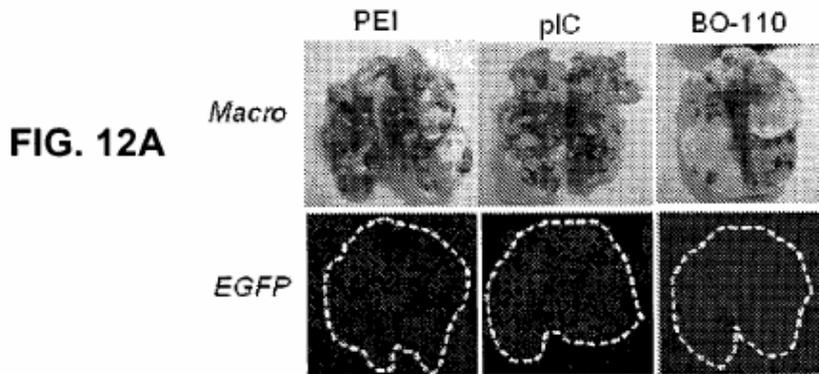


FIG. 12B

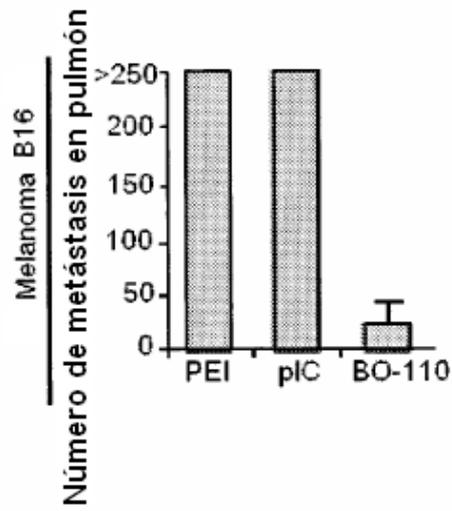


FIG. 12C

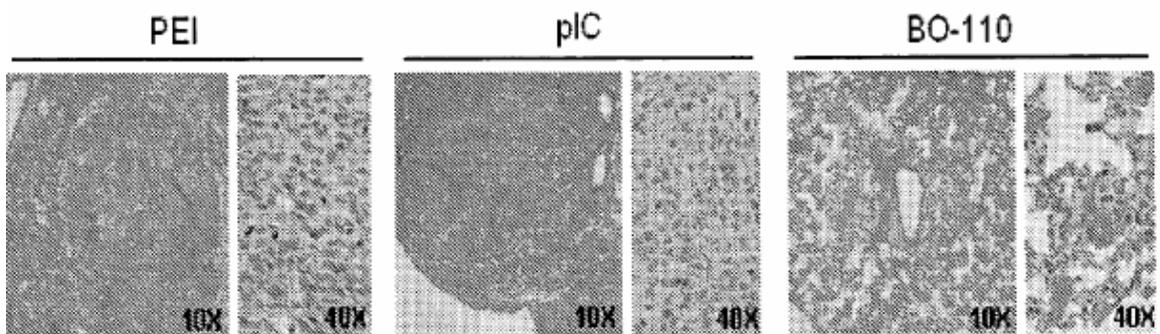


FIGURA 12 (cont.)

FIG. 12D

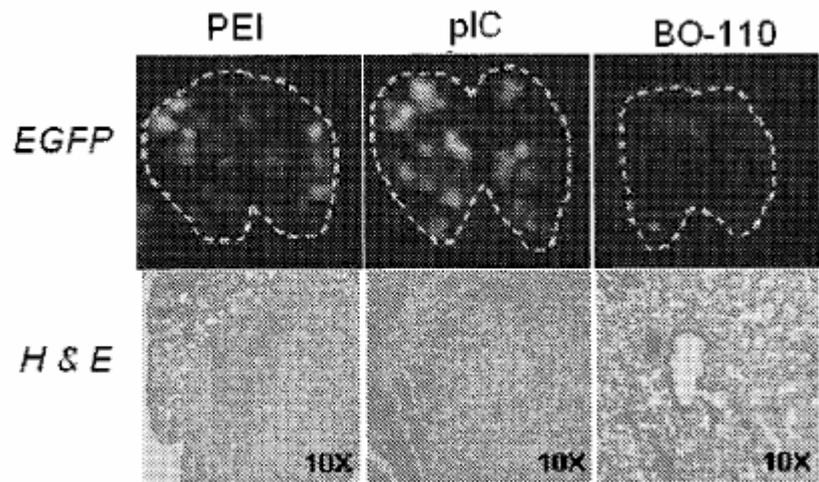


FIG. 12E

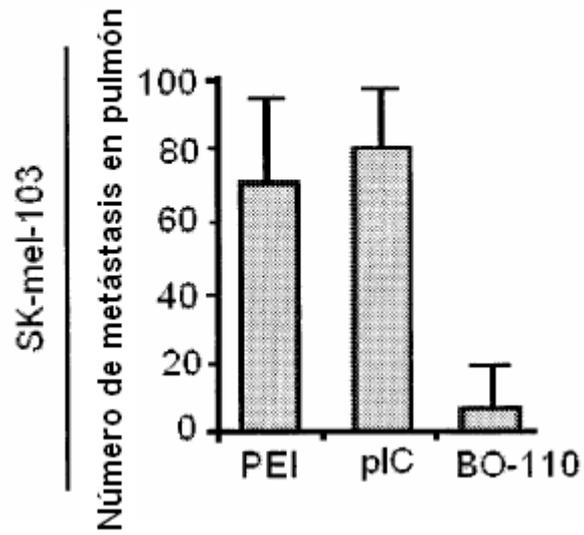


FIGURA 13

FIG. 13A

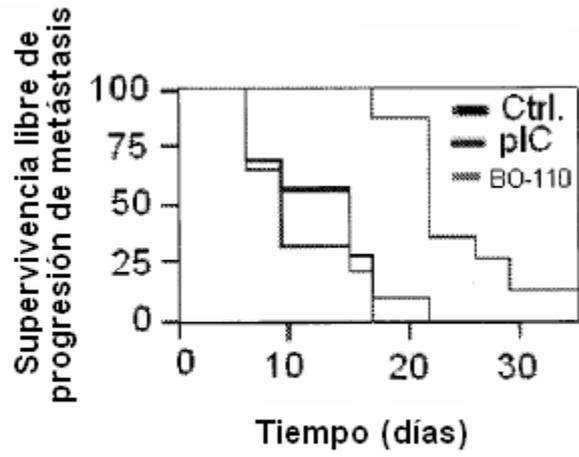


FIG. 13B

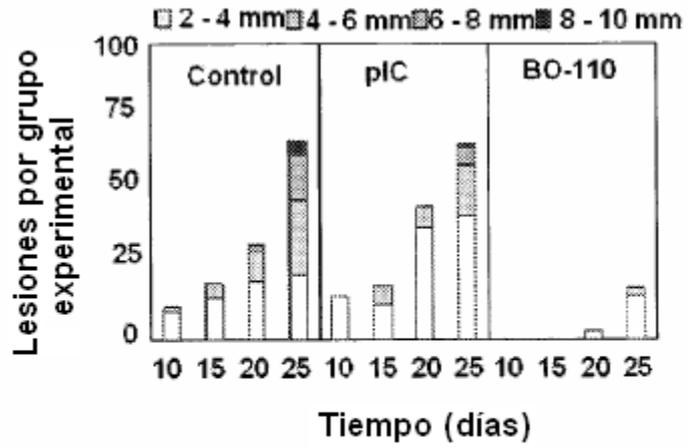


FIG. 13C

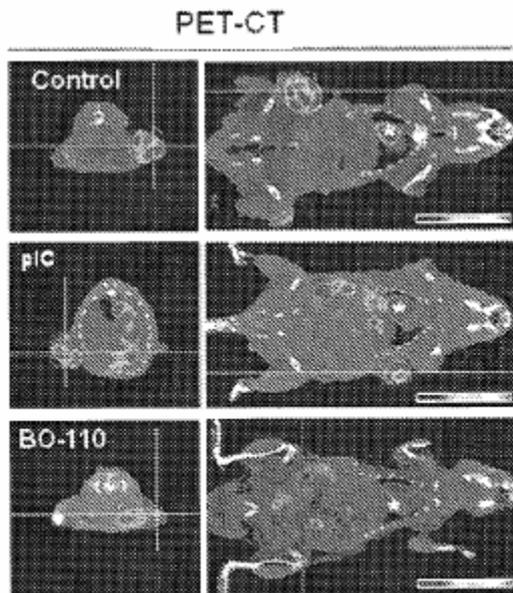


FIGURA 13 (cont.)

FIG. 13D

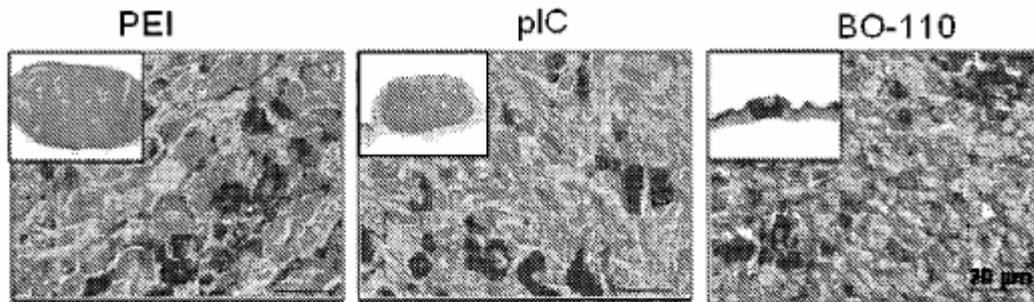


FIG. 13E

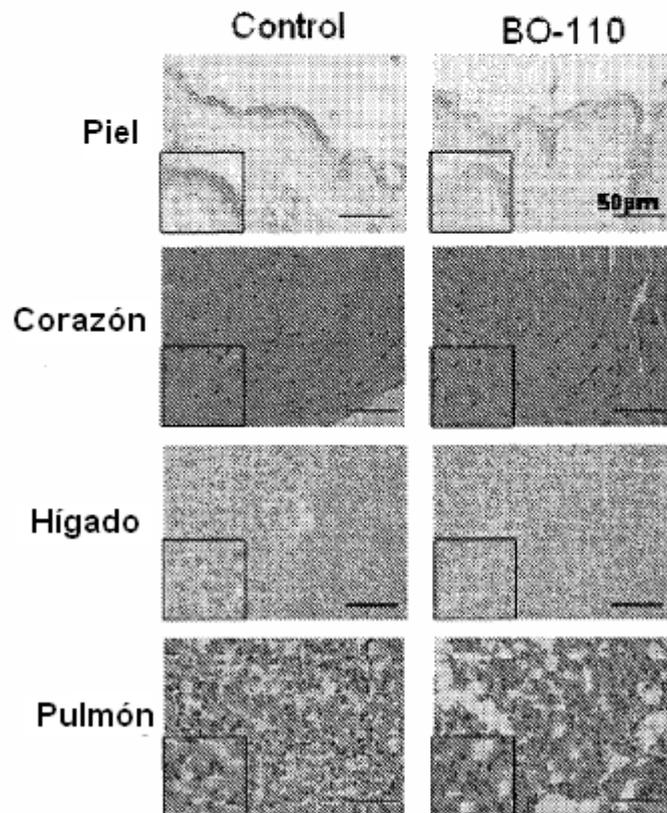


FIGURA 14

FIG. 14A

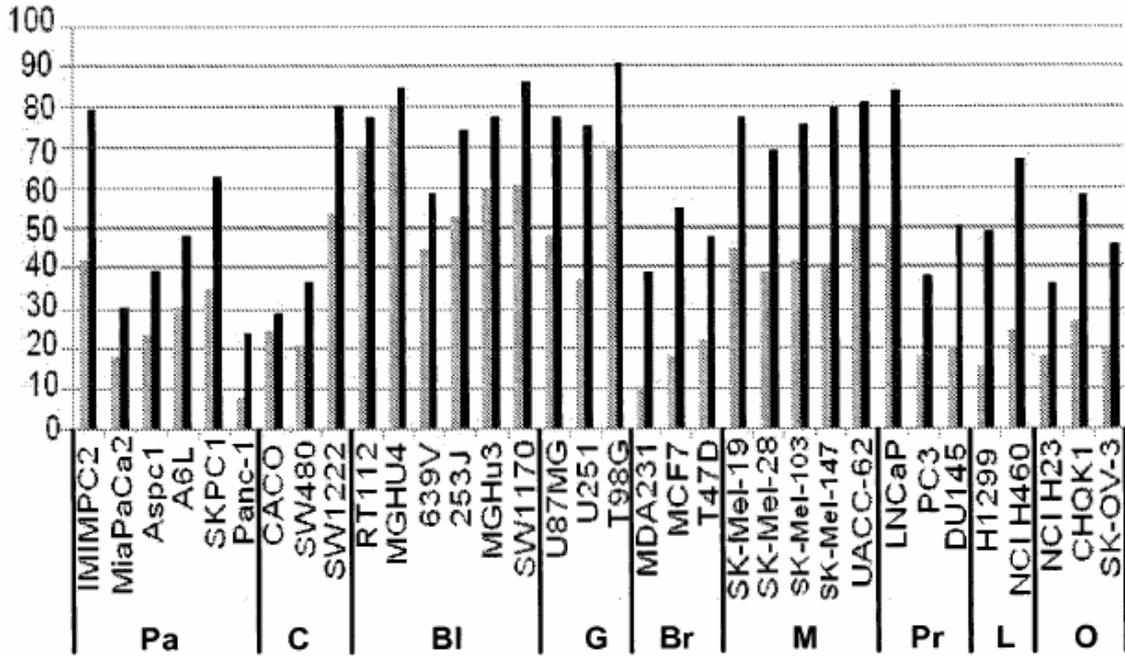


FIGURA 14 (cont.)

FIG. 14B

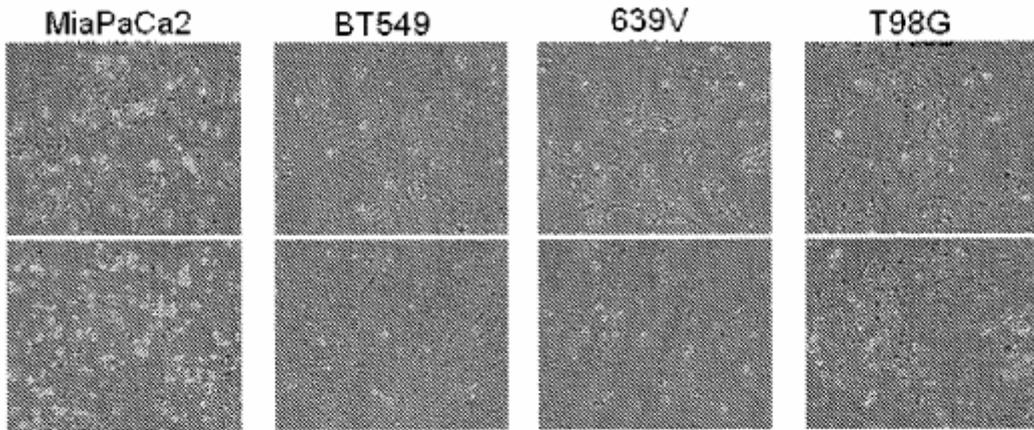


FIG. 14C

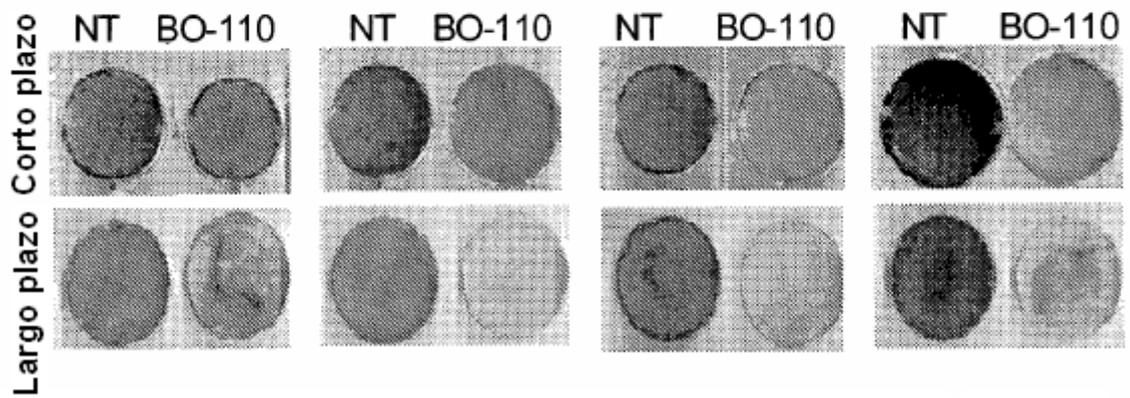
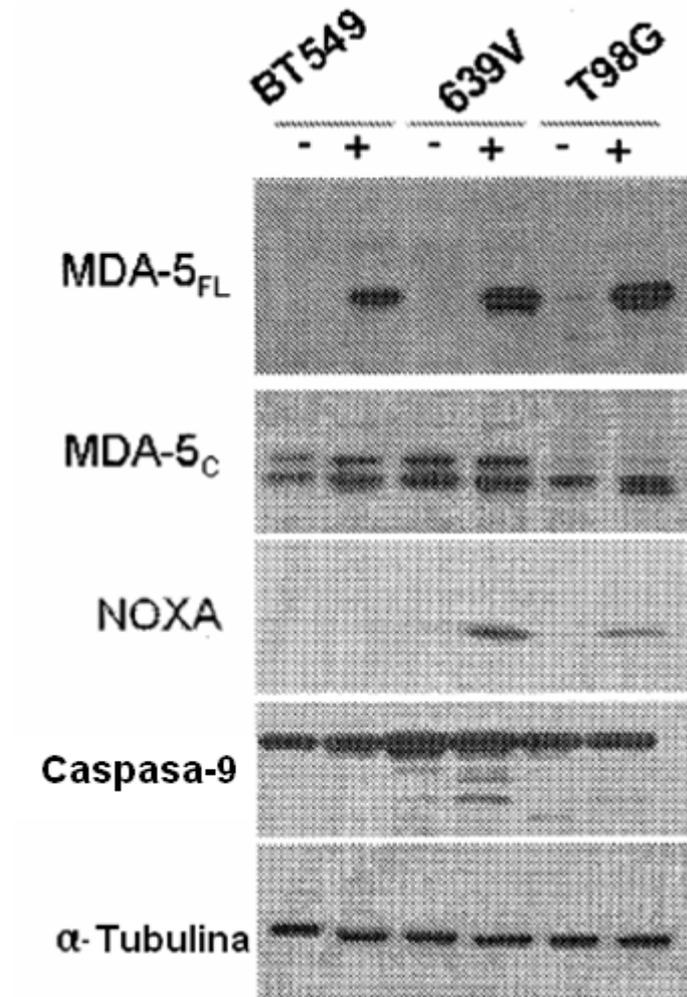


FIGURA 15



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 20070259372 A [0011]
- WO 2006001956 A [0017]
- WO 2004045491 A [0018]

Literatura no patente citada en la descripción

- ACKERMANN, J.; FRUTSCHI, M.; KALOULIS, K.; MCKEE, T.; TRUMPP, A.; BEERMANN, F. Metastasing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res*, 2005, vol. 65, 4005-4011 [0142]
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, vol. 124, 783-801 [0142]
- BARRAL, P.M.; MORRISON, J.M.; DRAHOS, J.; GUPTA, P.; SARKAR, D.; FISHER, P.B.; RACANELLO, V.R. MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells. *J Virol*, 2007, vol. 81, 3677-3684 [0142]
- CELADA, A.; GRAY, P.W.; RINDERKNECHT, E.; SCHREIBER, R.D. Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J Exp Med*, 1984, vol. 160, 55-74 [0142]
- CHIN, L.; GARRAWAY, L.A.; FISHER, D.E. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev*, 2006, vol. 20, 2149-2182 [0142]
- CROY, B.A.; CHAPEAU, C. Evaluation of the pregnancy immunotrophism hypothesis by assessment of the reproductive performance of young adult mice of genotype scid/scid.bg/bg. *J Reprod Fertil*, 1990, vol. 88, 231-239 [0142]
- DENOYELLE, C.; ABOU-RJAILY, G.; BEZROOKOVE, V.; VERHAEGEN, M.; JOHNSON, T.M.; FULLEN, D.R.; POINTER, J.N.; GRUBER, S.B.; SU, L.D.; NIKIFOROV, M.A. et al. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol*, 2006, vol. 8, 1053-1063 [0142]
- FECHER, L.A.; CUMMINGS, S.D.; KEEFE, M.J.; ALANI, R.M. Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol*, 2007, vol. 25, 1606-1620 [0142]
- FEHRENBACHER, N.; JAATTELA, M. Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res*, 2005, vol. 65, 2993-2995 [0142]
- FERNANDEZ, Y.; MILLER, T.P.; DENOYELLE, C.; ESTEBAN, J.A.; TANG, W.H.; BENGSTON, A.L.; SOENGAS, M.S. Chemical blockage of the proteasome inhibitory function of bortezomib: impact on tumor cell death. *J Biol Chem*, 2006, vol. 281, 1107-1118 [0142]
- FERNANDEZ, Y.; VERHAEGEN, M.; MILLER, T.P.; RUSH, J.L.; STEINER, P.; OIPARI, A.W., JR.; LOWE, S.W.; SOENGAS, M.S. Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res*, 2005, vol. 65, 6294-6304 [0142]
- FIELD, A.K.; TYTELL, A.A.; LAMPSON, G.P.; HILLEMANN, M.R. Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1967, vol. 58, 1004-1010 [0142]
- FLAHERTY, K.T. Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced melanoma. *Clin Cancer Res*, 2006, vol. 12, 2366s-2370s [0142]
- GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MAIRAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, 2007, vol. 445, 851-857 [0142]
- HERSEY, P.; ZHANG, X.D. Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2008, vol. 21, 358-367 [0142]
- HIPPERT, M.M.; O'TOOLE, P.S.; THORBURN, A. Autophagy in cancer: good, bad, or both?. *Cancer Res*, 2006, vol. 66, 9349-9351 [0142]
- HOYER-HANSEN, M.; JAATTELA, M. Autophagy: an emerging target for cancer therapy. *Autophagy*, 2008, vol. 4, 574-580 [0142]
- ILKOVITCH, D.; LOPEZ, D.M. Immune modulation by melanoma-derived factors. *Exp Dermatol.*, 2008 [0142]
- IVANOV .V.N.; BHOUMIKA; RONAIZE'EV. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene*, 2003, vol. 22, 3152-3161 [0142]
- JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T.; THUN, M.J. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2008, vol. 58, 71-96 [0142]

- KANG, D. C. ; GOPALKRISHNAN, R. V ; LIN, L. ; RANDOLPH, A. ; VALERIE, K. ; PESTKA, S. ; FISHER, P. B. Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. *Oncogene*, 2004, vol. 23, 1789-1800 [0142]
- KANG, D.C. ; GOPALKRISHNAN, R.V. ; WU, Q. ; JANKOWSKY, E. ; PYLE, A.M. ; FISHER, P.B. mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, vol. 99, 637-642 [0142]
- KAWAI, T. ; TAKAHASHI, K. ; SATO, S. ; COBAN, C. ; KUMAR, H. ; KATO, H. ; ISHII, K.J. ; TAKEUCHI, O. ; AKIRA, S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-1- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*, 2005, vol. 6, 981-988 [0142]
- KIRKWOOD, J.M. ; TARHINI, A.A. ; PANELLI, M.C. ; MOSCHOS, S.J. ; ZAROOUR, H.M. ; BUTTERFIELD, L.H. ; GOGAS, H.J. Next generation of immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol*, 2008, vol. 26, 3445-3455 [0142]
- KLIONSKY, D.J. ; ABELIOVICH, H. ; AGOSTINIS, P. ; AGRAWAL, D.K. ; ALIEV, G. ; ASKEW, D.S. ; BABA, M. ; BAEHRECKE, E.H. ; BAHR, B.A. ; BALLABIO, A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 2008, vol. 4, 151-175 [0142]
- KOVACSOVICS, M. ; MARTINON, F. ; MICHEAU, O. ; BODMER, J.L. ; HOFMANN, K. ; TSCHOPP, J. Overexpression of Helicard, a CARD-containing helicase cleaved during apoptosis, accelerates DNA degradation. *Curr Biol*, 2002, vol. 12, 838-843 [0142]
- KROEMER, G. ; LEVINE, B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, vol. 9, 1004-1010 [0142]
- KROEMER, G. ; GALLUZZI, L. ; VANDENABEELE, P. ; ABRAMS, J. ; ALNEMRI, E.S. ; BAEHRECKE, E.H. ; BLAGOSKLONNY, M.V. ; EL-DEITY, W.S. ; GOLSTEIN, P. ; GREEN, D.R. et al. Classification of cell death: recommendations for the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 2009, vol. 16, 3-11 [0142]
- LEV, D.C. ; ONN, A. ; MELINKOVA, V.O. ; MILLER, C. ; STONE, V. ; RUIZ, M. ; MCGARY, E.C. ; ANANTHASWAMY, H.N. ; PRICE, J.E. ; BAR-ELI, M. Exposure of melanoma cells to dacarbazine results in enhanced tumor growth and metastasis in vivo. *J Clin Oncol*, 2004, vol. 22, 2092-2100 [0142]
- LIN, L. ; SU, Z. ; LEBEDEVA, I.V. ; GUPTA, P. ; BOUKERCHE, H. ; RAI, T. ; BARBER, G.N. ; DENT, P. ; SARKAR, D. ; FISHER, P.B. Activation of Ras/Raf protects cells from melanoma differentiation-associated gene-5-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 2006, vol. 13, 1982-1993 [0142]
- MAIURI, M.C. ; ZALCKVAR, E. ; KIMCHI, A. ; KROEMER, G. Self-eating and selfkilling: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, vol. 8, 741-752 [0142]
- MIZUSHIMA, N. ; LEVINE, B. ; CUERVO, A.M. ; KLIONSKY, D.J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, vol. 451, 1069-1075 [0142]
- PAYNE, C.K. Imaging gene delivery with fluorescence microscopy. *Nanomed*, 2007, vol. 2, 847-860 [0142]
- QIN, J.Z. ; XIN, H. ; SITAIO, L.A. ; DENNING, M.F. ; NICKOLOFF, B.J. Enhanced killing of melanoma cells by simultaneously targeting Mcl-1 and NOXA. *Cancer Res*, 2006, vol. 66, 9636-9645 [0142]
- QIN, J.Z. ; ZIFFRA, J. ; STENNETT, L. ; BODNER, B. ; BONISH, B.K. ; CHATURVEDI, V. ; BENNETT, F. ; POLLOCK, P.M. ; TRENT, J.M. ; HENDRIX, M.J. et al. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res*, 2005, vol. 65, 6282-6293 [0142]
- ROBINSON, R.A. ; DEVITA, V.T. ; LEVY, H.B. ; BARON, S. ; HUBBARD, S.P. ; LEVINE, A.S. A phase I-II trial of multiple-dose polyriboinosic-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, 1976, vol. 57, 599-602 [0142]
- SCHATTON, T. ; MURPHY, G.F. ; FRANK, N.Y. ; YAMAURA, K. ; WAAGA-GASSER, A.M. ; GASSER, M. ; ZHAN, Q. ; JORDAN, S. ; DUNCAN, L.M. ; WEISHAUP, C. et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, 2008, vol. 451, 345-349 [0142]
- SOENGAS, M.S. ; LOWE, S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*, 2003, vol. 22, 3138-3151 [0142]
- SOENGAS, M.S. ; CAPODIECI, P. ; POLSKY, D. ; MORA, J. ; ESTELLER, M. ; OPITZ-ARAYA, X. ; MCCOMBIE, R. ; HERMAN, J.G. ; GERALD, W.L. ; LAZEBNIK, Y.A. et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 2001, vol. 409, 207-211 [0142]
- SOENGAS, M.S. ; GERALD, W.L. ; CORDON-CARDO, C. ; LAZEBNIK, Y. ; LOWE, S.W. Apaf-1 expression in malignant melanoma. *Cell Death Differ*, 2006, vol. 13, 352-353 [0142]
- TAWBI, H.A. ; KIRKWOOD, J.M. Management of metastatic melanoma. *Semin Oncol*, 2007, vol. 34, 532-545 [0142]
- TORMO, D. ; FERRER, A. ; BOSCH, P. ; GAFFAL, E. ; BASNER-TSCHAKARJAN, E. ; WENZEL, J. ; TUTING, T. Therapeutic efficacy of antigen-specific vaccination and toll-like receptor stimulation against established transplanted and autochthonous melanoma in mice. *Cancer Res*, 2006, vol. 66, 5427-5435 [0142]

- **VERMA, S. ; PETRELLA, T. ; HAMM, C. ; BAK, K. ; CHARETTE, M.** Biochemotherapy for the treatment of metastatic malignant melanoma: a clinical practice guideline. *Curr Oncol*, 2008, vol. 15, 85-89 [0142]
- Toll-like receptor-agonists in the treatment of skin cancer: history, current developments and future prospects. **WENZEL, J. ; TORMO, D. ; TUTING, T.** *Handb Exp Pharmacol*. 2008, 201-220 [0142]
- **WILCOX, R. ; MARKOVIC, S.N.** Tumor immunotherapy in melanoma: on the dawn of a new era?. *Curr Opin Mol Ther*, 2007, vol. 9, 70-78 [0142]
- **WOLTER, K.G. ; VERHAEGEN, M. ; FERNANDEZ, Y. ; NIKOLOVSKA-COLESKA, Z. ; RIBLETT, M. ; DE LA VEGA, C.M. ; WANG, S. ; SOENGAS, M.S.** Therapeutic window for melanoma treatment provided by selective effects of the proteasome on Bcl-2 proteins. *Cell Death Differ*, 2007, vol. 14, 1605-1616 [0142]
- **XIE, Z. ; KLIONSKY, D.J.** Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*, 2007, vol. 9, 1102-1109 [0142]
- **YONEYAMA, M. ; KIKUCHI, M. ; MATSUMOTO, K. ; IMAIZUMI, T. ; MIYAGISHI, M. ; TAIRA, K. ; FOY, E. ; LOO, Y.M. ; GALE, M., JR. ; AKIRA, S. et al.** Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*, 2005, vol. 175, 2851-2858 [0142]