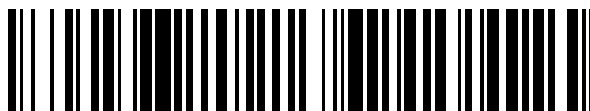


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 753**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/117 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2009** **PCT/IL2009/001210**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010** **WO2010073247**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2009** **E 09806144 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016** **EP 2379597**

54 Título: **Vector de ARN de doble cadena dirigido al EGFR para el tratamiento sistémico del cáncer**

30 Prioridad:

22.12.2008 US 139698 P

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

22.02.2017

73 Titular/es:

ALEX LEVITZKI MANAGEMENT AND HOLDINGS LTD. (100.0%)
11/6 Burla Street
9371411 Jerusalem, IL

72 Inventor/es:

LEVITZKI, ALEXANDER y
SHIR, ALEXEI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 602 753 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

Vector de ARN de doble cadena dirigido al EGFR para el tratamiento sistémico del cáncer

Campo de la invención

La presente descripción se dirige al campo de la terapia del cáncer y se refiere a vectores que comprenden ARN de doble cadena (ARNds) con un agente de unión al EGFR capaz de dirigir específicamente el ARNds a células cancerosas que sobre-expresan el EGFR, movilizándolo así el sistema inmunológico para el tratamiento de tumores que sobre-expresan el EGFR.

La presente invención se refiere a un vector dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que comprende una molécula de ARN de doble cadena (ARNds) con un péptido o polipéptido de unión al EGFR, para uso en el tratamiento del cáncer caracterizado por células que sobre-expresan el EGFR, en donde dicho tratamiento comprende una administración concomitante o secuencial de células inmunológicas, y en donde dichas células inmunológicas se seleccionan de células T infiltrantes de tumores (T-TILs), células T modificadas específicas para tumores y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

Además de ello, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y un vector dirigido al EGFR que comprende una molécula de ARN de doble cadena (ARNds) con un péptido o polipéptido de unión al EGFR, para uso en el tratamiento del cáncer caracterizado por células que sobre-expresan el EGFR, en donde dicho tratamiento comprende una administración concomitante o secuencial de células inmunológicas, y en donde dichas células inmunológicas se seleccionan de células T infiltrantes de tumores (T-TILs), células T modificadas específicas para tumores y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

Abreviaturas: ARNds: ARN de doble cadena; **EGF**: factor de crecimiento epidérmico; **EGFR**: Receptor del EGF; **PBMC**: células mononucleares de sangre periférica; **PEG**: poli(etilenglicol); **PEI**: polietilenimina; **pIC**, **PolilC**: ARN de doble cadena ácido poliinosínico-policitidílico; **pIC/MPPE**: PolilC/melitina-polietilenimina ramificada-polietilenglicol-EGF; **pIC/PPE**: PolilC/polietilenimina lineal-polietilenglicol-EGF; **pIC/PPGE11**: polilC/polietilenimina lineal-polietilenglicol-(péptido)GE11.

Antecedentes de la invención

Receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se sobre-expresa en una diversidad de tumores humanos sólidos, incluyendo carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, glioblastoma, carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas, cáncer colorrectal, adenocarcinoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga y cáncer de próstata (Hynes et al., 2009). La estimación anual de la Sociedad Americana del Cáncer de nuevos casos de cáncer y muertes proyecta 1.437.180 nuevos casos de cáncer en los Estados Unidos en 2008 y 565.650 muertes por cáncer. La causa de la mayoría de las muertes por cáncer es la metástasis del cáncer en órganos internos, que es virtualmente imposible de tratar por métodos convencionales. Una fracción significativa de todas las muertes relacionadas con el cáncer está asociada con la sobre-expresión de EGFR. Por lo tanto, EGFR es uno de los candidatos más importantes para la terapia del cáncer dirigida.

Las dos terapias más avanzadas dirigidas al EGFR son inhibidores pequeños de quinasa del EGFR permeables a la membrana y anticuerpos anti-EGFR, que impiden la activación del receptor y/o conducen a la regulación a la baja del receptor. Estos agentes inducen una remisión temporal o parcial y transmiten algunos beneficios de supervivencia, pero en realidad no curan a los pacientes. Esto es debido, lo más probablemente, porque el EGFR no es esencial para la supervivencia de las células cancerosas específicas.

PolilC, un ARN de doble cadena ácido poliinosínico-policitidílico sintético, es un agente citotóxico conocido. La administración intratumoral o peritumoral de PolilC no específico ha demostrado ser eficaz en la inmunoterapia antitumoral (Fujimura et al., 2006). Dicho tratamiento se limita sólo a tumores localizados, tal como ha sido demostrado por los intentos de aplicación sistémica de PolilC no específico para tratar el cáncer. El beneficio de supervivencia era mínimo, mientras que se observó una toxicidad sistémica pronunciada (Butowski et al, 2009; Salazar et al., 1996). El efecto débil fue probablemente provocado por la incapacidad de introducir una dosis suficiente de PolilC en las células tumorales. La mayor parte del PolilC no específico probablemente se dispersaba a través de los tejidos normales, penetrando en células no cancerosas e induciendo reacciones tóxicas.

Recientemente, los autores de la invención han desarrollado una estrategia que utiliza el alto nivel de expresión de EGFR, en lugar de su actividad per se, como el talón de Aquiles del tumor. Esto se logró mediante la utilización de un vector químico dirigido a EGFR cargado con PolilC (Shir et al, 2006; documento WO 04/045491). La aplicación intratumoral de PolilC/melitina-polietilenimina-polietilenglicol-EGF (PolilC/MPPE) a EGFR que sobre-expresa glioblastoma ($\sim 1 \times 10^6$ receptores/célula) desarrollado por vía intracraneal y al EGFR que sobre-expresa carcinomas de mama y epidermoides desarrollado como xenoinjertos en ratones inmunodeficientes, condujo a completar la eliminación de estos tumores localizados, curando a los ratones. Además de ello, los tumores que comprenden una

mezcla 1:1 de células que sobre-expresan EGFR de tipo salvaje y células que albergan el EGFRvIII mutante, que no internalizan el vector, también fueron erradicados por completo. Este "efecto espectador" fue debido a las citoquinas antiproliferativas tales como interferón- α , generados en el sitio del tumor por las células tumorales afectadas por PoliIC/MPPE.

5 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un vector dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que comprende una molécula de ARN de doble cadena (ARNds) con un péptido o polipéptido de unión al EGFR, para uso junto con células inmunológicas en el tratamiento del cáncer que sobre-expresan el EGFR, en donde dichas células inmunológicas se seleccionan de células T infiltrantes de tumores (T-TILs), células T modificadas específicas para tumores y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

La presente descripción se refiere, además, a una composición farmacéutica que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y un vector dirigido al EGFR para uso en un método para el tratamiento del cáncer caracterizado por células que sobre-expresan el EGFR, caracterizado porque dicho método comprende la administración sistémica a un paciente en necesidad de una combinación de: (i) un vector dirigido a EGFR que comprende una molécula de ARNds con un péptido o polipéptido de unión al EGFR capaz de dirigir el vector a células tumorales que sobre-expresan el EGFR; y (ii) células inmunológicas, seleccionadas de células T infiltrantes de tumores (T-TILs), células T modificadas específicas para tumores y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

En determinadas realizaciones, la presente descripción describe una composición farmacéutica para administración sistémica, que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y un vector dirigido al EGFR que comprende una molécula de ARNds de doble cadena con un polipéptido de unión al EGFR.

En otras determinadas realizaciones, la descripción describe una composición farmacéutica que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y un vector dirigido al EGFR para uso en un método para el tratamiento del cáncer caracterizado por células que sobre-expresan el EGFR, caracterizado porque dicho método comprende la administración sistémica a un paciente en necesidad de una cantidad eficaz de un vector dirigido al EGFR que comprende una molécula de ARNds de doble cadena con un polipéptido de unión al EGFR.

En determinadas realizaciones, el vector dirigido al EGFR comprende, además, un soporte de ácido nucleico, por ejemplo, compuesto de polietilenglicol (PEG) unido covalentemente a polietilimina (PEI), el ARNds es PoliIC asociado de forma no covalente con el resto PEI del soporte y el péptido o polipéptido de unión al EGFR es EGF o el péptido GE11 unido covalentemente al resto PEG del soporte.

Los vectores y las composiciones descritos en esta memoria están destinados al tratamiento de un cáncer seleccionado de carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, glioblastoma, carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas, cáncer colorrectal, adenocarcinoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga o cáncer de próstata y metástasis de los mismos.

35 Breve descripción de los dibujos

Las **Figs. 1A-C** representan gráficos de barras que muestran que las PBMCs son selectivamente activadas por el medio de células MDA-MB-468 y A431 transfectadas con PoliIC/MPPE. 500.000 PBMCs se sembraron en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante la noche en 0,5 ml de medio tal como se describe en Métodos. Las PBMCs fueron luego enfrentadas a 0,5 ml de medio separado de células A431, MDA-MB-468, U87MG o U138MG transfectadas con PoliIC/PEI-PEG-EGF+PEI-Mel 48 horas después de la transfección. El medio de PBMC se recogió 24 y 48 horas después del enfrentamiento e IFN- γ , IL-2 y TNF- α se midieron utilizando ensayos ELISA. **(1A)** Expresión de IL-2 en el medio de PBMCs, 24 y 48 h después del desafío. **(1B)** Expresión de IFN- γ en el medio de PBMCs, 48 h después del enfrentamiento. **(1C)** Expresión de TNF- α en el medio de PBMCs, 48 h después del enfrentamiento. "Sin tratamiento" muestra la expresión de las citoquinas en PBMC no sometido a enfrentamiento. "UT" muestra la expresión de las citoquinas por PBMCs enfrentadas al medio de células no transfectadas. Ácido poliglútamico (pGlu)/MPPE se empleó como control.

Las **Figs. 2A-D** muestran que células inmunológicas se infiltran en tumores que sobre-expresan EGFR tratados con PoliIC/MPPE+PBMC, pero no en células U138MG (sin la expresión de EGFR). Células A431 **(2A)** o MDA-MB-468 **(2B)** se inyectaron por vía subcutánea (s.c.) en el costado derecho y U138MG **(2C-2D)** se inyectaron en el costado izquierdo de ratones SCID-NOD (compárese la **FIG. 2A** con la **FIG. 2C** y la **FIG. 2B** con la **FIG. 2D**). Cuando los tumores alcanzaron aprox. 100 mm³, el tratamiento se inició con 3 inyecciones consecutivas I.V. de PoliIC/MPPE de 5 μ g/ratón/día. 24 h después de la última inyección de PoliIC/MPPE se inyectaron 3 millones de PBMCs I.P. 24 h más tarde se extrajeron los tumores, y se fijaron en formalina al 4%. Se prepararon entonces secciones de parafina, se tiñeron con H&E y se sometieron a análisis histopatológico. Las líneas discontinuas muestran las zonas de infiltración de células inmunológicas.

Las **Figs. 3A-D** muestran el efecto espectador mediado por PBMC. **Fig. 3A**. Para demostrar el efecto espectador mediado por PBMC, 100.000 células MDA-MB-468 se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante la noche con 2 ml de medio (Shir et al., 2006). Las células fueron luego transfectadas con PolilC/MPPE, a las concentraciones indicadas. 48 h después de la transfección se añadieron 0,5 ml de medio de las células transfectadas ("medio acondicionado") a 500.000 PBMCs que habían sido sembradas 24 h antes en placas de 24 pocillos y se cultivaron en 0,5 ml de medio. A continuación, 0,1 ml de medio de las PBMCs sometidas a enfrentamiento se intercambiaron por 0,1 ml de medio de células MDA-MB-468 no transfectadas adicionales ("células indicadoras") sembradas 24 horas antes. La supervivencia de estas células se determinó por el ensayo azul de metileno, 48 horas después del enfrentamiento con el medio de las PBMCs (barras en negro en el gráfico). En paralelo, para mostrar el efecto espectador directo, se utilizaron 0,1 ml de medio acondicionado para reemplazar 0,1 ml de medio de células MDA-MB-468 no transfectadas ("células indicadoras") sembradas 24 h antes en placas de 96 pocillos y se cultivaron en 0,2 ml de medio. La supervivencia de estas células se determinó 48 horas después de la adición del medio acondicionado utilizando azul de metileno (barras rayadas); la **Fig. 3B** muestra el efecto espectador de células MDA-MB-468 transfectadas con poli IC en células U138MG no transfectadas; las **Figs. 3C-3D** muestran el efecto espectador de células A431 transfectadas con poli IC en células A431 no transfectadas y células U138MG no transfectadas, respectivamente. "Sin tratamiento" muestra la supervivencia de células indicadoras que no se sometieron a ningún intercambio de medio. "PBMCs UT" muestra la supervivencia de células indicadoras tratadas con medio de PBMCs no sometidas a enfrentamiento. "UT" muestra la supervivencia de células indicadoras tratadas con medio de PBMCs sometidas a enfrentamiento por medio de las células no transfectadas. "Sin PBMCs" (barras grises) indica la supervivencia cuando el medio acondicionado se añadió al medio de cultivo de PBMC, pero en ausencia de PBMCs, y esto se utilizó 48 horas más tarde para desafiar a las células indicadoras. Este último control se utilizó para detectar un posible efecto residual espectador directo del medio acondicionado después de la incubación en medio de PBMCs en ausencia de PBMCs.

Las **Figs. 4A-C** muestran el exterminio de células cancerosas *in vitro* mediante PBMCs activadas. Las células se cultivaron tal como se describe en Métodos. Las células fueron transfectadas luego con PolilC/MPPE a razón de 0,1 µg/ml. 24 h más tarde se añadieron 500.000 PBMCs/pocillo a las células cancerosas y se co-incubaron durante otras 24 h. Las células apoptóticas (puntos brillantes) se visualizaron utilizando un kit de Anexina-V-Biotina (Biosource, Inc.). Para distinguir las células tumorales de PBMCs, las células tumorales se marcaron con anticuerpo EGFR conjugado con FITC (Biosource, Inc., células grises). Las células se visualizaron con un microscopio de fluorescencia y se fotografiaron utilizando una cámara digital: células A431, células MDA-MB-468 y células U138MG se muestran en las **Figs. 4A, 4B y 4C**, respectivamente.

Las **Figs. 5A-E** muestran el efecto del tratamiento con PolilC/MPPE/PBMC sobre la supervivencia de ratones con tumores diseminados. Se establecieron tumores diseminados tal como se describe en Métodos. (**5A**) Análisis histopatológico de pulmones de ratón en el momento de inicio del tratamiento (15 días después de la inyección de células). Las flechas apuntan a un tumor en un capilar pulmonar. (**5B, 5C**) 15 días después de la inyección de células, los animales se dividieron aleatoriamente en grupos (5 ratones por grupo) y se inició el tratamiento con 4 inyecciones intravenosas consecutivas de 20 µg de PolilC/MPPE a intervalos de 24 h. 24 h después de la última inyección de PolilC, a los animales se les inyectaron una vez cuatro millones de PBMCs. (**5B**) muestra la supervivencia de animales con tumores A431. (**5C**) muestra la supervivencia de animales con tumores MDA-MB-468. pGlu/MPPE, ácido poliglutámico/MPPE; UT, No tratados. (**5D, 5E**) 10 días después de la inyección de células los animales se dividieron al azar en grupos (5 ratones por grupo) y el tratamiento se inició con 3 ciclos de 3 o 4 inyecciones intravenosas consecutivas de 20 µg de PolilC/MPPE a intervalos de 24 h (10 inyecciones en total). El intervalo entre ciclos fue de 48 h. Este procedimiento elimina los efectos tóxicos del tratamiento tales como la pérdida de peso (datos no mostrados). Los grupos control incluían ratones tratados con pGlu/MPPE (ácido poliglutámico/MPPE) para determinar el efecto del conjugado sin PolilC y tampón HBG (Glucosa tamponada con Hepes) (2). (**5D**) muestra la supervivencia de animales con tumores A431. (**E**) muestra la supervivencia de animales con tumores MDA-MB-468. UT, no tratados.

La **Fig. 6** representa el efecto de los vectores pIC/MPPE y pIC/PPE sobre la supervivencia de células transfectadas con los mismos. Las células utilizadas fueron U87MG y MDA-MB468 (4000 células en cada caso), que expresan diferentes niveles de EGFR (U87MG expresan 1×10^5 EGFR; MDA-MB468 expresan 2×10^6 EGFR) y U138MG (3000 células) no expresan EGFR. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante la noche. Las células fueron transfectadas con pIC formulado con el conjugado MP_{25Br}PE o P₂₂₁PE. La supervivencia de las células se analizó mediante el ensayo de azul de metileno 48 h después de la transfección. UT, células no tratadas. pGlu, células tratadas con ácido poliglutámico.

La **Fig. 7** representa el efecto de los vectores pIC/PPE y pIC/PPGE11 sobre la supervivencia de las células transfectadas con los mismos. Las células utilizadas fueron MCF7, MDA-MB231 (MDA231), U87MG, U87MGwtEGFR y MDA-MB468 (MDA468) (4000 células de cada una), que expresan diferentes niveles de EGFR (MDA231 expresan $3-7 \times 10^5$, U87MG expresan 1×10^5 EGFR; MDA468 expresan 2×10^6 EGFR) y U138MG (3000 células) que no expresan EGFR. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante la noche. Después, las células fueron transfectadas con el pCI formulado con el conjugado P₂₅₁PE o P₂₅₁PGE11. La

supervivencia de las células se analizó mediante el ensayo de azul de metileno 48 h después de la transfección. UT, células no tratadas.

Las **Figs. 8A-B** muestran el efecto de diferentes vectores (pGlu/MPPE, pGlu/PPE, pIC/MPPE y pIC/PPE) *in vivo* en el crecimiento s.c. de A431 en ratones inmunodeficientes. Para el experimento representado en **8A**, a ratones hembra de 4-5 semanas de edad se les inyectaron s.c. 2 millones de células A431 (línea celular de carcinoma epitelial humano que expresa altos niveles de EGFR) disueltas en 200 μ l de PBS. Cuando los tumores alcanzaron $\sim 80 \text{ mm}^3$, los ratones se dividieron en 5 grupos con 5 animales por grupo. 10 μ g de pCI formulado con el conjugado indicado fueron inyectados por vía IV cada 48 h. Para el experimento representado en **8B**, a ratones hembra de 6-7 semanas de edad se les inyectaron s.c. 2 millones de células U138MG disueltas en 100 μ l de PBS. Cuando los tumores alcanzaron $\sim 75 \text{ mm}^3$, los ratones se dividieron en 3 grupos con 9 animales por grupo. A los ratones se les inyectó IV la dosis indicada de pIC/P₂₂₁PE (10 ó 25 μ g/ratón una vez cada 48 horas). pGlu, ácido poliglutámico.

Descripción detallada de la invención

En determinadas realizaciones descritas en esta memoria, la presente descripción proporciona un vector dirigido al EGFR que comprende una molécula de ARNs, un agente conocido por su citotoxicidad y capacidad de penetración en las células; con un péptido o polipéptido de unión al EGFR capaz de dirigir el vector a las células tumorales que sobre-expresan EGFR, para uso en combinación con las células inmunológicas para el tratamiento de tumores que sobre-expresan EGFR, en donde dichas células inmunológicas se seleccionan de células T infiltrantes de tumores (T-TILs), células T modificadas específicas para tumores y células mononucleares de sangre periférica (PBMcs).

En determinadas otras realizaciones, la presente descripción describe una composición farmacéutica que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y un vector dirigido al EGFR para uso en un método para el tratamiento del cáncer caracterizado por células que sobre-expresan el EGFR, caracterizado porque dicho método comprende la administración sistémica a un paciente en necesidad de una combinación de: (i) un vector dirigido a EGFR que comprende una molécula de ARNs con un péptido o polipéptido de unión al EGFR capaz de dirigir el vector a células tumorales que sobre-expresan el EGFR; y (ii) células inmunológicas, seleccionadas de células T infiltrantes de tumores (T-TILs), células T modificadas específicas para tumores y células mononucleares de sangre periférica (PBMcs).

La molécula de ARNs para su uso en esta memoria es una molécula de doble cadena sintética que puede incluir un número diferente, pero preferiblemente el mismo número de ribonucleótidos en cada una de las cadenas. Cada una de las cadenas de la molécula de ARNs puede comprender los mismos o diferentes tipos de ribonucleótidos, incluyendo inosinato (I), citidilato (C), adenilato (A), guanilato (G) y uridilato (U). En determinadas realizaciones preferidas, cada una de las cadenas se compone de un solo tipo de ribonucleótidos y, más preferiblemente, los ribonucleótidos de las dos cadenas son pares de ribonucleótidos de emparejamiento, por ejemplo, pares de adenilato-uridilato o inosinato-citidilato.

En determinadas realizaciones preferidas, el ARNs está compuesto en su totalidad de pares de ribonucleótidos de emparejamiento, más preferiblemente pares de inosinato (I)-citidilato (C). Por lo tanto, la molécula de ARNs incluye una cadena de ácido poliinosínico y una cadena de ácido policitidílico y a ella se alude en esta memoria como "poliIC" o "pIC". PoliIC puede estimular la liberación de citoquinas citotóxicas y, mediante la inducción de la producción de interferón-gamma, puede aumentar el número y las actividades tumoricidas de diversas células inmunoematopoyéticas.

El poliIC del vector descrito en esta memoria puede estar compuesto de cadenas de ARN que comprenden cada uno al menos 22, preferiblemente al menos 85 ribonucleótidos. En determinadas realizaciones, cada una de las cadenas tiene un número de ribonucleótidos dentro del intervalo de 100-300.

El péptido o polipéptido de unión a EGFR capaz de dirigir el vector a células tumorales que sobre-expresan el EGFR puede ser un polipéptido, por ejemplo, EGF por sí mismo. En determinadas realizaciones, el péptido de unión al EGFR es un ligando de péptido para EGFR tales como el péptido 12-mero GE11 de la secuencia YHWYGYTPQNV1 aislado de un banco de fagos, sintetizado y que demuestra unirse al EGFR de forma competitiva con EGF (Li et al, 2005; Song et al, 2008).

El ARNs está preferiblemente asociado de forma no covalente al resto de dirección del vector. Esto facilita la disociación del ARNs desde el resto de dirección después de la llegada a la célula/tejido fijado como objetivo y su internalización en la célula/el tejido tumoral que provoca la producción de quimioquinas que atraen células inmunológicas al sitio del tumor.

La asociación no covalente del poliIC con la molécula de dirección se efectúa preferiblemente a través de un soporte de ácido nucleico que está asociado tanto con la molécula de ARNs como con el resto de dirección.

El soporte de ácido nucleico puede comprender un polímero plicatiónico y/o un polímero soluble en agua no iónico.

Polímeros policatiónicos que se pueden utilizar como soportes de ácidos nucleicos incluyen poli-L-lisina o, preferiblemente, polietilenimina (PEI). PEI es un polímero policatiónico con la capacidad de asociarse de forma no covalente con las moléculas de ARN de doble cadena debido a la naturaleza polianiónica de este último, neutralizando de este modo las cargas electrostáticas negativas de la molécula de ARNs y, por lo tanto, contrarrestando cualquier tendencia del ARNs a interactuar químicamente con moléculas aniónicas. El uso de polietilenimina en la transfección de células con polinucleótidos es bien conocido en la técnica; sin embargo, en su uso tradicional, la polietilenimina porta el ARNs a la membrana celular, se adhiere a la misma, se somete a una absorción endosomal y suministra subsiguientemente al citoplasma el ARNs tras la degradación de la membrana endosomal. Por el contrario, en la presente descripción, la focalización y la unión del ARNs al receptor de EGFR en la superficie de células cancerosas es la principal vía para la internalización del ARNs.

El polímero no iónico soluble en agua para su uso como soporte de ácido nucleico en la presente invención es preferiblemente poli(etilenglicol) (PEG), que es biocompatible, biológicamente inerte y se utiliza ampliamente para portar fármacos in vivo.

En determinadas realizaciones preferidas, el soporte de ARNs utilizado en esta memoria comprende tanto polietilenimina (PEI) como polietilenglicol (PEG), que está unido de forma covalente a la PEI. PEG confiere una excelente solubilidad en agua y la distribución de tejido al complejo y aumenta su semivida en el suero.

La PEI puede ser ramificado o lineal y tiene un peso molecular seleccionado de aproximadamente 1-25 kDa, aproximadamente 5-23 kDa, aproximadamente 15-25 kDa, y el PEG tiene un peso molecular seleccionado de aproximadamente 0,3-50 kDa, aproximadamente 1- 20 kDa, aproximadamente 3-10 kDa. En determinadas realizaciones, el soporte de ARNs comprende PEI de 25 kDa ramificado. En determinadas realizaciones preferidas, el soporte de ARNs se compone de PEI lineal de 22 kDa unida covalentemente a PEG de 3, 4 kDa.

El resto de dirección del vector, a saber el péptido o polipéptido de unión al EGFR preferiblemente está acoplado de forma covalente al resto de PEG del conjugado PEI-PEG, mientras que el poliIC está asociado de forma no covalente con el resto PEI, por ejemplo, por asociación iónica.

En determinadas realizaciones, el soporte de ácido nucleico puede comprender, además, un compuesto capaz de facilitar la degradación de una membrana endosomal, facilitando así la liberación de la molécula de ARNs desde un endosoma de célula/tejido diana al citoplasma, en que el ARNs de manera óptima media en la citotoxicidad. En determinadas realizaciones, este compuesto es melitina o un derivado de melitina, que preferiblemente está asociado de forma covalente con la polietilenimina del soporte de ARNs.

Ejemplos de vectores dirigidos al EGFR que se pueden utilizar de acuerdo con la invención incluyen, sin limitación, los vectores designados en esta memoria pIC/MPPE (que comprende poliIC/melitina-PEI-PEG ramificado de 25 kDa-EGF, descrito en Shir et al., 2006 y el documento WO 04/045491) y los nuevos vectores pIC/PPE (que comprenden poliIC/PEI-PEG lineal de 22 kDa-EGF) y pIC/PPGE11 (que comprende poliIC/PEI-PEG lineal de 22 kDa-péptido GE11).

Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la presente descripción proporciona los nuevos vectores dirigidos al EGFR pIC/PPE y pIC/PPGE11, en esta memoria caracterizados como vectores de segunda generación (vis-à-vis los vectores de primera generación tales como pIC/MPPE descritos en el documento WO 04/045491).

Los vectores de segunda generación no comprenden melitina y comprenden PEI lineal en lugar de PEI ramificada. Además, en uno de los vectores de segunda generación, el EGF de ratón (mEGF) recombinante fue reemplazado por el péptido 12-mero GE11. Además de la simplificación del procedimiento de preparación de los vectores de segunda generación en comparación con los de primera generación, se encontró también que la sustitución de la PEI ramificada por la PEI lineal proporcionó una mayor eficiencia en el exterminio de células cancerosas. Esto es bastante sorprendente, ya que en los vectores de segunda generación existe sólo una molécula de EGF en cada una de las moléculas de PEI lineal frente a varios EGFs en la PEI ramificada de los vectores de primera generación y se podría esperar una menor afinidad por el EGFR para el segundo vectores de generación.

Para que un tumor se convierta en establecido, se debe evitar la eliminación por el sistema inmunológico. Muchos cánceres desarrollan mecanismos de inhibición de la vigilancia inmunológica e incluso pueden crecer en presencia de linfocitos inmunológicos que reconocen antígenos de cáncer. Los mecanismos de esta inhibición local no están claros, aunque se han examinado muchas teorías. PoliIC, un potente adyuvante, e interferón, un fuerte activador inmunológico, bien pueden superar esta inhibición local y activar los linfocitos inmunológicos de cáncer pre-existentes específicos, además de atraer y activar otras células inmunológicas.

Los autores de la invención han demostrado previamente (Shir et al., 2006) que las células cancerosas transfectadas con poliIC dirigido al EGFR secretan las citoquinas Gro- α (oncogén regulado en crecimiento-alfa) e IP-10, que son conocidos por ser capaces de atraer células inmunológicas. No estaba claro, sin embargo, si estas citoquinas se secretan en cantidades suficientes para provocar realmente que las células inmunológicas se acumulen en el sitio de las células cancerosas.

- Se ha encontrado de acuerdo con la presente descripción que estas citoquinas, inducidas por PolilC dirigido, atraen células inmunitarias al tumor transfectado y potencian fuertemente la eficiencia con la que se exterminan las células cancerosas. Esto induce un efecto sinérgico significativo, conduciendo a la eliminación completa de tumores diseminados, incluso cuando se trata de una distancia con una dosis total baja de poli IC dirigido al EGFR (véase el Ejemplo 6). Las células inmunológicas activadas aumentan fuertemente el efecto espectador provocado por IFN- α (véase el Ejemplo 4), que debería facilitar el exterminio de los cánceres heterogéneos. Dado que PolilC/MPPE es dirigido selectivamente a las células cancerosas, no es de esperar que se produzcan significativas reacciones sistémicas inmunotóxicas. El hecho de que las PBMCs humanas inyectadas en ratones no indujeran reacción alguna de injerto frente a huésped, mientras que inducían una reacción antitumoral fuerte, apoya esta suposición.
- Como se mencionó anteriormente en esta memoria, la administración intratumoral o peritumoral de PolilC no dirigida ha demostrado ser eficaz en la inmunoterapia antitumoral (Fujimura et al., 2006). Dicho tratamiento se limita sólo a tumores localizados. Por el contrario, PolilC dirigido al EGFR es eficiente en el tratamiento de tumores diseminados que son imposibles de tratar mediante una terapia local.
- Por lo tanto, PolilC dirigido al EGFR se puede combinar con varias inmunoterapias del cáncer tal como se enseña por la presente invención. Estas inmunoterapias del cáncer incluyen vacunas contra el cáncer y células T dirigidas al cáncer (modificadas o extraídas). Para mediar en los efectos antitumorales *in vivo*, las células T dirigidas al cáncer han de transitar al sitio del tumor, extravasarse de la circulación y luego mediar en las funciones efectoras para provocar la destrucción de células cancerosas (Rosenberg, 2008). IP-10 y Gro-alfa inducidos fuertemente por PolilC dirigido selectivamente en células tumorales (Tablas 2, 3) deberían facilitar tanto el tránsito al tumor como la extravasación, mientras que el interferón debería potenciar el exterminio del cáncer mediado por las células T.
- Además, el trasplante alogénico de células inmunológicas para activar reacciones de injerto frente al tumor (Ciceri et al., 2007) se puede combinar con los vectores dirigidos al EGFR de la presente invención como se muestra en esta memoria. La inyección de PBMCs extraños en ratones tratados con PolilC/MPPE en la presente invención (Figs. 5B, C), se asemeja en realidad a una combinación de este tipo. Células inmunológicas injertadas deberían conferir un efecto antitumoral más fuerte que las propias células inmunológicas del paciente.
- Ejemplos de células inmunológicas para uso en combinación con el vector dirigido al EGFR de la presente invención son células T infiltrantes de tumores (TILs), células T modificadas específicas para tumores y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Las células T modificadas son células que han sido genéticamente reprogramadas o "redirigidas" para expresar el receptor de células T (TCR) reactivo al tumor o moléculas de TCR quiméricas que muestran la capacidad de reconocimiento del tumor similar a anticuerpos, conocidos como "cuerpos T". El enfoque de cuerpos T combina el reconocimiento de anticuerpos y la función de las células T efectoras. Se basa en células T que expresan receptores quiméricos compuestos de Fv o scFv derivados de anticuerpos como sus elementos de reconocimiento extracelulares unidos a las moléculas desencadenantes de linfocitos. A diferencia de los anticuerpos, las células T son muy adecuadas para penetrar y destruir tumores sólidos.
- Las células inmunológicas se pueden administrar de forma concomitante con el vector, pero preferiblemente el vector y las células inmunes se administran secuencialmente. En determinadas realizaciones preferidas, el vector se administra sistémicamente primero, seguido de la administración de las células inmunológicas en un intervalo deseado. Es importante destacar que, el vector y las células inmunológicas exhiben sinergia en el exterminio de las células de un tumor.
- A la vista de los resultados experimentales obtenidos en ratones con el vector descrito en esta memoria en combinación con PBMC, esta terapia combinada puede ser beneficiosa y puede conducir a una curación completa en pacientes con cáncer con un sistema inmunológico funcional.
- Por lo tanto, aquí se demuestra, por primera vez, una estrategia para erradicar tumores que sobre-expresan EGFR diseminados en ratones SCID, cuyo sistema inmunológico ha sido reconstituido con linfocitos de sangre periférica humana (PBMC). La administración intravenosa de melitina-polietilenimina-polietilenglicol-EGF (PolilC/MPPE) durante 4 días, seguido el 5º día por una inyección intraperitoneal de 4 millones de PMBC, inducía la curación completa de los ratones SCID-NOD con tumores que sobre-expresan EGFR diseminado pre-establecido, sin efectos secundarios adversos. Las células inmunológicas y las citoquinas que producen se localizan en el sitio del tumor de los animales tratados. Doce meses después de cesar el tratamiento, los ratones tratados permanecen sanos y libres de cáncer. Se demuestra además en esta memoria que el sistema inmunológico se dirige al sitio de los tumores, debido a las quimioquinas producidas por el poliIC internalizado, lo que indica que un vector dirigido al EGFR cargado con poliIC puede movilizar el sistema inmunológico para tratar y, posiblemente, curar pacientes con tumores que sobre-expresan EGFR diseminados.
- La combinación vector dirigido al EGFR/células inmunológicas de la presente invención se puede utilizar en el tratamiento del cáncer caracterizado por la expresión de EGFR. El término "expresión", tal como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que incluye también el término "sobre-expresión", que por su naturaleza es un término relativo a menudo evaluado en la técnica mediante la medición de la amplificación génica relativa o el número de

receptores presentes en una célula cancerosa en comparación con el número de receptores presentes en una célula normal, por ejemplo tal como se muestra en la **Tabla 1**. Por lo tanto, la sobre-expresión puede definirse como la amplificación de dos o más veces el gen *EGFR*, tal como se determina por hibridación fluorescente (FISH) *in situ*, o como una tinción positiva (1+, 2+ o 3+) utilizando anticuerpos anti-EGFR en un ensayo inmunohistoquímico (IHC).

Otros criterios utilizados en la técnica para determinar la sobre-expresión es la fracción de membrana celular marcada con un anticuerpo específico; por lo tanto, la sobre-expresión de EGFR puede definirse como al menos 1% de tinción membranosa y 1+ intensidad, o al menos 10% de tinción membranosa. Además, las células pueden ser clasificadas como células que no expresan, o que tienen niveles no detectables de EGFR, células que expresan niveles bajos de EGFR (aproximadamente 1000 a aproximadamente 10.000 receptores/célula), niveles medios de EGFR (aproximadamente 10.000 a aproximadamente 100.000 receptores/célula) y células que expresan altos niveles de EGFR (aproximadamente 1×10^6 o más receptores/célula). Por lo tanto, el cáncer susceptible de tratamiento utilizando las combinaciones descritas en esta memoria son cánceres caracterizados por una amplificación de dos veces o más del gen *EGFR*, ensayo IHC positivo (1+, 2+ o 3+), al menos 1%, o al menos 10% de tinción membranosa, niveles medios de EGFR y, preferiblemente, células cancerosas caracterizadas por altos niveles de EGFR.

La expresión "tratamiento del cáncer", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la inhibición del crecimiento de células cancerosas. Preferiblemente, un tratamiento de este tipo también conduce a la regresión del crecimiento del tumor, es decir, a la disminución en el tamaño o la regresión completa del tumor. En realizaciones preferidas, la expresión se refiere al tratamiento y al alivio o a la curación completa de tumores diseminados, a saber, de las metástasis.

Los términos "tumor" y "cáncer" se utilizan indistintamente en esta memoria. En particular, la combinación descrita en esta memoria es útil en el tratamiento de un cáncer que sobre-expresa EGFR seleccionado de carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, glioblastoma, carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas, cáncer colorrectal, adenocarcinoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga y cáncer de próstata y metástasis de los mismos.

Tabla 1 Prevalencia de la sobre-expresión/amplificación de HER1/EGFR en diversos estudios clínicos.

Fuente	N	Definición de sobre-expresión de HER1/EGFR o amplificación de EGFR	Porcentaje de tumores con sobre-expresión de HER1/EGFR o amplificación de EGFR
Dancer et al., 2007, Oncol Rep., 18: 151-55	32	Amplificación dos veces o mayor del gen <i>EGFR</i> por parte de FISH	65%
Bloomston et al, 2006 Dig. Surg.23 :74-9	71	Tinción 1+ o mayor mediante IHC	69%
Thybusch-Bernhardt et al, 2001, J Surg Investig 2:393-400	24	Tinción positiva mediante IHC	33%
Onn et al, 2004, Clin Cancer Res 10:136-143	111	Tinción 2 ó 3 mediante IHC	60%
Rusch et al, 1993, Cancer Res 53:2379-85	44	Detección incrementada mediante análisis Northern	45%
Selvaggi et al, 2004, Ann Oncol 15:28-32	48	Tinción 2+ o 3+ mediante IHC	37%
Ohtsuka et al, 2006, 1:787-795	48	Tinción 2+ o 3+ mediante transferencia Western	40%

En la descripción anterior con los primeros vectores de generación (Shir et al., 2006) se demostró una erradicación con éxito de tumores localizados mediante inyección intratumoral de vectores dirigidos a PolilC-EGFR. Esto no enseñó que sería posible tratar tumores diseminados mediante la administración sistémica de los vectores, ya que no era del todo claro si una cantidad terapéuticamente eficaz de vectores alcanzaría los tumores.

- 5 Se ha encontrado ahora y se ha demostrado en esta memoria por primera vez en los Ejemplos que figuran más adelante que la administración sistémica de PolilC dirigido al EGFR es eficaz en la erradicación de tumores, incluso a concentraciones sorprendentemente bajas (tan bajas como 10 ng/ml PIC), que un experto en la técnica no habría esperado que fuesen lo suficientemente altas como para acumularse en el tumor en los niveles terapéuticamente eficaces. Además, otra ventaja es que PolilC dirigido al EGFR afecta a las células cancerosas sólo, dejando ilesas a
- 10 las células normales.

- Como se describe previamente, el vector PolilC dirigido al EGFR ejerce una fuerte efecto espectador, es decir, extermina a las células que sobre-expresan EGFR, así como células tumorales vecinas, expresen o no EGFR o su versión mutada EGFRvIII. Se demostró que las células que sobre-expresan EGFR transfectadas con PolilC dirigido al EGFR secretan la citoquina anti-proliferativa IFN- α que probablemente provocaba al menos parte del efecto
- 15 espectador. Esto es crucial, ya que incluso los tumores que muestran una fuerte sobre-expresión de EGFR son comúnmente heterogéneos con respecto a la expresión de EGFR. Al mismo tiempo, PolilC dirigido al EGFR es altamente selectivo para células tumorales, con efectos tóxicos mínimos sobre los tejidos normales circundantes, así como sobre tejidos normales distantes. El PolilC dirigido activa rápidamente múltiples vías antiproliferativas/pro-apoptóticas, minimizando la probabilidad de mutaciones que conducen a la resistencia a los fármacos.

- 20 Por lo tanto, en determinadas realizaciones, los vectores dirigidos al EGFR descritos en esta memoria (tanto los vectores de primera como de segunda generación) están destinados a la administración sistémica.

La presente descripción describe, además, una composición farmacéutica para la administración sistémica que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y un vector dirigido al EGFR que comprende una molécula de ARNds de doble cadena con un polipéptido de unión al EGFR.

- 25 La descripción describe todavía, además, una composición farmacéutica que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y un vector dirigido al EGFR para uso en un método para el tratamiento de cáncer caracterizado por células que sobre-expresan EGFR, caracterizada porque dicho método comprende la administración sistémica a un paciente en necesidad de una cantidad eficaz de un vector dirigido al EGFR que comprende una molécula de ARNds de doble cadena con un polipéptido de unión al EGFR.

- 30 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y un vector dirigido al EGFR para uso en un método para el tratamiento del cáncer caracterizado por la sobre-expresión de EGFR a través de la movilización del sistema inmunológico, caracterizada porque dicho método comprende la administración sistémica a un sujeto en necesidad de una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector dirigido al EGFR que comprende una molécula de ARNds de doble
- 35 cadena con un polipéptido de unión al EGFR, generando así citoquinas que atraen a las células inmunológicas a los sitios del tumor y provocando el potenciamiento de la eficiencia del exterminio de células tumorales.

- Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente descripción pueden formularse de manera convencional utilizando uno o más soportes farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares. Técnicas para la formulación y administración de fármacos pueden encontrarse, por ejemplo, en
- 40 "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., última edición.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se formulan para la administración sistémica por cualquier vía adecuada, por ejemplo, para el suministro parenteral, incluyendo la inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea, intratecal o intraperitoneal.

- Para cualquier composición para utilizar en el método descrito en esta memoria, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos in-vitro y de cultivo celular. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir una concentración o título deseado. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Tal como se muestra a continuación en los Ejemplos, una dosis de 5 μ g de vector/ratones/día fue suficiente para erradicar tumores pre-establecidos en ratones. Una dosis equivalente aproximado esperada para la administración a un ser humano se puede calcular utilizando fórmulas conocidas que son de 20 μ g/kg o 1,2 mg/día para un adulto de 60 kg y de 2,0 mg/día para un adulto de 100 kg. Por lo tanto, la dosis para la administración sistémica en un ser humano, la dosis debería estar en el intervalo de 0,1 mg/día a 20 mg/día.
- 45
- 50

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes Ejemplos.

Ejemplos

En los Ejemplos siguientes, los vectores se describen en forma abreviada.

Materiales y Métodos

(i) Reactivos y Ensayos. Poli IC se obtuvo de Sigma (Rehovot, Israel). El peso molecular puede variar de un lote a otro con un intervalo de 90.000 a 1.400.000, con una media de 200.000 a 500.000. Dado que un par de bases tiene el PM de 680 Da, 90.000 Da = 133 pb; 1.400.000 Da = 2059 pb; 200.000 Da = 294 pb; y 500.000 Da = 735 pb (información del PM tomada del sitio web de Sigma). Se disolvió en H₂O bidestilada tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC). La polietilenimina (PEI), PEI₂₅, ramificadas y 3- 2-piridilditio)propionato de succinimidilo (SPDP) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Munich, Alemania). NHS-PEG-MAL (PM ¼ 3400) se obtuvo de Nektar Therapeutics (Huntsville, Alabama, EE.UU.) y el EGF de ratón (mEGF) recombinante de Pepro Tech EC Ltd. (Londres, Reino Unido). El contenido de PEI del conjugado se determinó espectrofotométricamente mediante el ensayo de TNBS a 405 nm. La cantidad de enlazadores ditiopiridina en la PEI se determinó después de la reducción de una parte alícuota con ditiotreitolo (DTT), seguido de medición de la absorción de piridina-2-tiona liberada a 343 nm. La relación molar de mEGF:ditiopiridina se determinó espectrofotométricamente a 280 y 340 nm. La cantidad de ditiopiridina se determinó tal como se describe [6,7]. El rendimiento de EGF (mg) se calculó en dos ecuaciones. Ecuación 1: $A_{280(a)} = A_{340}$ con DTT x 5,1/8,1. Ecuación 2: A_{280} revisado = $A_{280} - A_{280(a)}$. El resultado de la ecuación 2 era la cantidad de EGF en mg. Se utilizó el ensayo de Ellman para la determinación de los grupos mercapto en EGF-SH. La cromatografía líquida de conjugados se realizó con el sistema básico ÄKTA de Amersham Biosciences (Little Chalfont, Reino Unido). Melitina (Mel) (D-Mel-SH; e280 ¼ 5570, PM ¼ 2893,6) se adquirió de IRIS Biotech GmbH (Marktredwitz, Alemania). Todos los otros productos químicos, incluyendo PEI lineal, se adquirieron de Sigma-Aldrich.

Componentes del complejo pIC:soporte: ARNs en forma de un complejo sintético de ácido poliinosínico-ácido policitidílico (pIC) que tiene cadenas de ARN 100-300 ribonucleótidos de longitud se obtuvo de Pharmacia-Amersham. Para la preparación de los vectores, el poliIC se mezcla con el conjugado MPPE, PPE o PEGE11 descrito en esta memoria. El reactivo de transfección FuGENE6 se obtuvo de Roche. Soportes de ARNs de polietilenimina (PEI)2s-poli(etilenglicol) (PEG)-factor de crecimiento epidermal (EGF) y de PEh-melitina (MEL) covalentemente conjugados se sintetizaron tal como se describe más adelante.

Preparación de soporte de PEI₂₅-PEG-EGF (PPE) covalentemente conjugado

Una guía general para la preparación del soporte PEI₂₅-PEG-EGF covalentemente conjugado se proporciona en Current Protocols in Human Genetics, Suplemento 11, Capítulo: Vectors for Gene Therapy, 12.3.17; 12.3.18. John Wiley & Sons, Inc., 1996.

Reactivos: PEI ramificada de PM medio 25 kDa, según se determina mediante dispersión de la luz (PEhs) y SPDP se adquirieron de Sigma-Aldrich (Múnich, Alemania). N-hidroxisuccinimidil-polietilenglicol-maleimida (NHS-PEG-MAL, PM = 0,4 kDa) se obtuvo de Nektar Therapeutics. El compuesto NHS-PEG-MAL se utiliza para conjugar restos que tienen un grupo reactivo adecuado para PEG. EGF de ratón recombinante se adquirió de Pepro Tech EC Ltd. (Londres, Reino Unido).

Cromatografía líquida: La cromatografía líquida se realizó usando una bomba Waters 626 y detector de matriz de diodos 996.

Cuantificación de PEI: El contenido de PEI de los conjugados se determinó espectrofotométricamente a través de ensayo de ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) a 405 nm tal como se describió previamente (Snyder y Sobocinski, 1975. Anal. Biochem. 64, 284-288).

Determinación de la cantidad de enlazadores de ditiopiridina: La cantidad de enlazadores de ditiopiridina que podría ser generada en PEI₂₅ para conjugaciones se determinó después de la reducción de una parte alícuota con ditiotreitolo (DTT), seguido de medición de la absorción de piridina-2-tiona liberada a 343 nm ($\epsilon = 80801M$ cm).

Cuantificación de grupos reactivos maleinimida en NHS-PEG-MAL: La cantidad de grupos reactivos maleinimida en NHS-PEG-MAL se calculó espectrofotométricamente como una función de la absorbancia a 300 nm (A₃₀₀). Una disolución de 1 mg/ml de NHS-PEG-MAL en agua tiene una DO₃₀₀ de 0,15 para un tramo de 1 cm. La cantidad de los grupos reactivos maleinimida en el conjugado PEI₂₅-PEG-MAL se calculó de manera similar por la diferencia en A₃₀₀ antes y después de la adición de 10 microlitros de disolución 1 molar de DTT a 100 microlitros de la muestra (la adición de DTT separa la A₃₀₀ del grupo maleinimida por la deslocalización de electrones).

Cuantificación de la Concentración de EGF: La concentración de EGF recombinante soluble se calculó mediante la medición de la absorción de EGF en disolución a 280 nm: una disolución de 1 mg/ml de EGF en agua da como resultado una DO de 3,1 (tramo de 1 cm). La relación molar de EGF y ditiopiridina en un conjugado de EGF-PDP se determina espectrofotométricamente a 280 y 340 nm. Para la cantidad de absorción de ditiopiridina se mide a 340

nm (véase más arriba). La absorción inicial del conjugado se mide a 280 nm (A280); para corregir la absorción de ditiopiridina a 280 nm, este valor se corrige mediante las ecuaciones siguientes.

Ecuación 1: $A_{280} a = A_{340} \text{ con DTT} \times 5,1/8,1$.

Ecuación 2: $A_{280} \text{ revisada} = A_{280} - A_{280} a$.

- 5 El resultado de la ecuación 2 se utiliza para calcular la concentración final de EGF. Se utiliza un ensayo de Ellman para la determinación de los grupos mercapto en EGF-SH.

Síntesis de PEI₂₅-PEG-MAL: Una parte alícuota de 1,6 micromoles de PEI₂₅ obtenida mediante filtración en gel (Sephadex G-25, superfino; Amersham Biosciences) disuelto en NaCl 0,25 M se ajustó a pH 4,4 mediante la adición cuidadosa de HCl. Se añadió una parte alícuota de 6,4 micromoles de NHS-PEG-MAL disueltos en 0,4 ml de agua, y después de 1 hora de reacción a temperatura ambiente la concentración de sal se ajustó a NaCl 1 M. Esta mezcla se cargó en una columna de intercambio catiónico (Macro-prep High S; 10/10; BioRad, Munich, Alemania) y se fraccionó utilizando un gradiente de sal de NaCl 1-3 M en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5 con un caudal de 0,5 ml/minuto. El fraccionamiento se realizó utilizando Tampón A (acetato de sodio 20 mM pH 4,5) y Tampón B (NaCl 3 M, acetato de sodio 20 mM pH 4,5), como sigue: Tiempo = 0-15 minutos: 56% de Tampón A, 44% de Tampón B; 10 Tiempo = 15-20 minutos: 44-100% de Tampón B; Tiempo = 20-60 minutos: 100% de Tampón B. El detector se ajustó a 240 y 300 nm, y el producto se eluyó en el Tiempo = 40-50 minutos. La relación molar de PEI₂₅ y los grupos reactivos de maleinimida era 1:1,6. 15

Síntesis de EGF-PDP: Se mezclaron una parte alícuota de 5 mg de EGF (PM = 6 kDa) se dializó durante la noche contra HEPES 20 mM pH 7,1 (desgasificado con argón). Una parte alícuota de 0,5 micromoles de EGF y una parte alícuota de 5 micromoles de SPDP de un material 10 mM en etanol al 100%. La concentración de etanol en la mezcla fue de aproximadamente 33% (v/v). Después de 3 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se cargó en una columna de filtración en gel (G-10; columna 5 HR10/30, Amersham Biosciences, Alemania; HEPES 20 mM, pH 7,1 con etanol al 20%). El producto (4 ml), detectado a 300 nm, se eluyó en el Tiempo = 18-26 min. El rendimiento fue de 3,36 mg de EGF modificado con 0,77 micromoles de ditiopiridina. 20

Síntesis de EGF-SH: Una parte alícuota de 0,56 micromoles de EGF se mezcló con 50 equivalentes de DTT en 100 microlitros de agua. Después de 5 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se cargó en una columna de filtración en gel (G-10; columna HR10/30, Amersham Biosciences, Alemania; HEPES 20 mM, pH 7,1 con etanol al 20%). El producto (5,5 ml), detectado a 280 nm, se eluyó en el Tiempo = 17-28 minutos. La relación molar de EGF a grupos -SH fue de 1:1,82. 25

Síntesis de PEI₂₅-PEG-EGF (PPE): Una parte alícuota 0,28 micromolar de EGF que contiene 0,51 micromoles de grupos tiol se mezcló bajo argón con PEI₂₅-PEG-MAL que contiene 0,51 micromoles de grupos maleinimida reactivos. El pH final de la mezcla de reacción era 6, y la concentración de sal final era NaCl 0,3 M. Después de una incubación durante 26 horas a temperatura ambiente la concentración de sal de la mezcla de reacción se ajustó a 0,5 M con NaCl 3 M, la mezcla de reacción se cargó en una columna de intercambio catiónico (Macro-prep High S; 1011 0; BioRad, Munich, Alemania) y se fraccionó con un gradiente salino de NaCl 0,5-3M en HEPES 20 mM, pH 7,1 utilizando un caudal de 0,5 ml/minuto y el detector se ajustó a 280 nm. El fraccionamiento se realizó utilizando Tampón A (HEPES 20 mM pH 7,1) y Tampón B (HEPES 20 mM pH 7,1, NaCl 3 M), como sigue: Tiempo = 0-20 minutos: 78% de Tampón A, 22% de Tampón B; Tiempo = 20-80 minutos: 22-100% de Tampón B; Tiempo = 80-90 minutos: 100% de Tampón B. El conjugado se eluyó a NaCl 2,4-3 M (10 ml agrupados). Las fracciones (Tiempo = 10-28 minutos, producto B) en la parte isocrática también se agruparon (9 ml). El producto se dializó durante la noche a 4°C frente a tampón HBS (HEPES 20 mM pH 7,1, NaCl 150 mM), pH 7,3 (desgasificado con argón). Se determinó la cantidad de EGF en el conjugado (0,65 mg) y en el producto B (0,98 mg) espectrofotométricamente a 280 nm. La concentración de PEI₂₅ en el conjugado (136 nmol) y en producto B (38 nmol) se determinó espectrofotométricamente mediante el ensayo de TNBS a 405 nm. La relación molar de EGF a PEI₂₅ en el conjugado fue de 0,8:1. 30 35 40 45

Síntesis de Mel-PEI₂₅-PEG-EGF. mEGF-PEG-PEI₂₅ (83 nmol de PEI) se mezcló con SPDP (664 nmol en etanol al 100%) bajo argón. Después de 3 h a temperatura ambiente, la mezcla de aproximadamente 2 ml se cargó en una columna de filtración en gel (Sephadex G25 superfina; HR10/30; HEPES 20 mM [pH 7,1], NaCl 0,5 M; Amersham Biosciences). El conjugado funcionalizado de PDP (piridilditiopropionilo) purificado (5 ml) que contenía 309 nmol de PDP se concentró a 1,5 ml por vacío de velocidad. Para la reacción con melitina (Mel), 464 nmol de Mel se pesaron y se disolvieron en 0,5 ml de NaCl 0,5 M, HEPES 100 mM [pH 7,4] desgasificado con argón. Ambos componentes se mezclaron bajo argón. Después de 20 h a temperatura ambiente, mEGF-PEG-PEI₂₅-Mel se purificó mediante filtración en gel. Para filtrar en gel el conjugado, se utilizó una columna 10/30 de calidad Superdex 75 prep, acondicionada con PEI₂₅ (10 mg de PEI₂₅/60 ml de material de gel). Después de la diálisis durante la noche (MWCO 14.000; Visking tipo 27/32; Roth, Karlsruhe, Alemania) contra HBS se obtuvieron 6 ml de conjugado mEGF-PEI EGF₂₅-Mel (MPPE); éstos contenían 66 nmol de PEI (1,64 mg), 350 nmol de Mel y 70 nmol de EGF. 50 55

Células: Células A431 (ATCC® No. CRL-1555™), MDA-MB-468 (ATCC® N° HTB-132™), U-138 MG (ATCC® N° HTB-16™), MCF7, MDA-MB-231 (ATCC® N° HTB-26™), (ATCC® N° HTB-14™) y U87MGwtEGFR.

Extracción de PBMC. PBMCs de donantes humanos sanos fueron separadas en Ficoll Paque (Pharmacia), se lavaron dos veces con 50 ml de medio RPMI 1640, se resuspendieron a una densidad de 4×10^6 /ml y se cultivaron en este medio suplementado con suero de ternero fetal al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin.

Mediciones de citoquinas: Gro- α , IP-10, IFN- β , IFN- γ , IL-2, TNF- α se midieron utilizando ELISA específico para citoquinas (Biosource, Inc.).

Expresión de citoquinas en tumores y sangre. Las células fueron inyectadas s.c. en los costados derecho (A431 o MDA-MB-468) e izquierdo (U138MG) de ratones SCID/NOD. 17 días más tarde, cuando los tumores alcanzaron aprox. 100 mm³, se inició el tratamiento de la siguiente manera: 3 inyecciones I.V. consecutivas de PoliIC/MPPE de 5 µg/ratón/día. 24 h después de la última inyección de PoliIC/MPPE, 4 millones de PBMCs recientes fueron inyectados I.P. 48 h más tarde se extrajeron los tumores, se homogeneizaron con 1,5 mL de tampón de extracción (que contenía Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%) por gramo de tejido, utilizando un homogeneizador. Los homogeneizados se centrifugaron a 13.000 Xg durante 10 minutos a 4°C, se almacenaron a -70°C y después se sometieron a ELISAs. Los ELISAs también se realizaron en muestras de sangre tomadas 24 h después de la última inyección de PoliIC/MPPE ("Sangre 3d") y 48 h después de la inyección de PBMC ("Sangre"). Los números muestran pg de citoquina por 1 gramo de tejido (1 ml de sangre = 1 g)

Efecto espectador mediado por PBMC. 100.000 células MDA-MB-468 o A431 se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante la noche con 2 ml de medio por pocillo (2). Las células fueron transfectadas luego con PoliIC/MPPE, a una concentración final de 0,1 ó 0,5 µg/ml. 48 h después de la transfección se añadieron 0,5 ml de medio de las células transfectadas ("medio acondicionado") a 500.000 PBMCs que habían sido sembradas 24 h antes en placas de 24 pocillos y se cultivaron en 0,5 ml de medio. 0,1 ml de medio de las PBMCs sometidas a enfrentamiento se cambiaron después por 0,1 ml de medio a partir de células MDA-MB-468 no transfectadas adicionales y células U138MG ("células indicadoras") se sembraron en placas de 96 pocillos 24 h antes. La supervivencia de estas células se determinó por el ensayo de azul de metileno (2), 48 horas después del desafío con el medio de las PBMCs.

En paralelo, para mostrar el efecto espectador directo, se utilizaron 0,1 ml de medio acondicionado para reemplazar 0,1 ml de medio de células indicadoras no transfectadas sembradas 24 h antes en placas de 96 pocillos y se cultivaron en 0,2 ml de medio. Se determinó la supervivencia de estas células 48 horas después de la adición del medio acondicionado utilizando azul de metileno.

Exterminio de células cancerosas in vitro mediante PBMCs activadas. 20000 células A431, 30.000 células MDA-MB-468 o 20.000 células U138MG fueron sembradas en placas de 24 pocillos y cultivadas durante la noche en 1 ml de medio RPMI suplementado con FCS al 10% y antibióticos. Las células fueron transfectadas después con PoliIC/MPPE a razón de 0,1 mg/ml. 24 h más tarde se añadieron 500.000 PBMCs/pocillo a las células cancerosas y se co-incubaron durante otras 24 h. Las células apoptóticas (fluorescencia roja) se visualizaron utilizando un kit de Anexina-V-Biotina (Biosource, Inc.). Para distinguir las células tumorales de PBMCs, las células tumorales se marcaron con anticuerpo EGFR conjugado con FITC (Biosource, Inc., fluorescencia verde). Las células se visualizaron con un microscopio de fluorescencia y se fotografiaron utilizando una cámara digital.

Efecto del tratamiento con PoliIC/MPPE/CMSF sobre la supervivencia de ratones con tumores diseminados. A ratones hembra SCID-NOD (Harlan) se les inyectaron IV 1 millón de células A431 o MDA-MB-468 suspendidas en 200 µl de PBS. 10 ó 15 días más tarde, los animales se dividieron en grupos al azar (5 ratones por grupo) y se inició el tratamiento con una serie de inyecciones intravenosas de 20 µg de PoliIC/MPPE. 24 h después de la última inyección de PoliIC, a los animales se les inyectaron una vez cuatro millones de PBMCs.

EJEMPLO 1 PoliIC/MPPE induce la expresión de citoquinas inmunoactivas en células A431 y MDA-MB-468

En el estudio anterior de los autores de la invención (2) éstos demostraron que una dosis baja de PoliIC dirigida al EGFR inducía la expresión de IFN- α , IP-10 y Gro- α en células de glioblastoma que sobre-expresan EGFR (U87MGwtEGFR), pero no en células con bajos niveles de EGFR (U87MG). Estos datos apoyan la noción de que las células producen estas citoquinas sólo cuando se ha internalizado un determinado nivel umbral de ARNs, y de que esta dosis se logra sólo en las células que sobre-expresan el EGFR. En este estudio los autores de la invención han extendido el análisis a dos líneas celulares de cáncer que sobre-expresan el EGFR adicionales: A431 (carcinoma de vulva) y MDA-MB-468 (carcinoma de mama). Cuando estas células fueron transfectadas con PoliIC/MPPE (2,5 µg/ml), los autores de la invención detectaron hasta 5.1 pg / ml de IFN- β ; 148 pg/ml de Gro- α y 188 pg/ml de IP-10 (**Tabla 2**). Gro- α e IP-10 son quimioquinas responsables del reclutamiento de células T para la zona en la que se expresan. Así, las células A431 y MDA-MB-468, al igual que las células U87MGwtEGFR, secretan citoquinas en el medio, después de la estimulación con PoliIC/MPPE.

Tabla 2. Expresión de citoquinas en el medio de células transfectadas con poliIC/MPPE

	A431		MDA-MB-648	
poliIC/MPPE	-	+	-	+
IFN- β (pg/ml)	0	5.1	0	4,1
Gro- α (pg/ml)	14	148	0	121
IP-10 (pg/ml)	23	188	20	138

Ejemplo 2 Activación *in vitro* de células inmunológicas humanas

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, los autores de la invención hipotizaron que el medio enriquecido en citoquinas a partir de células A431 y MDA-MB-468 tratadas con PoliIC/MPPE debería estimular el sistema inmunológico. Examinaron si esto era así, probando el efecto del medio procedente de las células cancerosas transfectadas con PoliIC sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) sanas humanas. Las PBMCs consisten en varios tipos de células inmunológicas (NK, células T, células NK-T, macrófagos). Cuando se activan, estas células producen citoquinas tóxicas tales como IFN- γ y TNF- α , que se sabe son eficaces contra diversas células cancerosas. Las PBMCs también interactúan entre sí, dando lugar a un efecto sinérgico, altamente anti-proliferativo. Por ejemplo, células T activadas y células NK producen IFN- γ , que activa los macrófagos y estimula la producción de TNF- α . La liberación de IL-2 en el medio se correlaciona directamente con la activación de PBMC y puede ser convenientemente cuantificada mediante ELISA. Por lo tanto, las PBMCs son un sistema conveniente para el estudio de la reacción inmunológica selectiva contra células tumorales transfectadas con PoliIC.

Las PBMCs fueron enfrentadas a medio procedente de células cancerosas transfectadas con PoliIC/MPPE. Para este fin, 500.000 PBMCs se sembraron en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante la noche en 0,5 ml de medio tal como se describe en Métodos. Las PBMCs fueron luego enfrentadas a 0,5 ml de medio separado de células A431, MDA-MB-468, U87MG o U138MG transfectadas con PoliIC/PEI-PEG-EGF+PEI-Mel 48 h después de la transfección. El medio de PBMC se recogió 24 y 48 horas después del enfrentamiento e IFN- γ , IL-2 y TNF- α se midieron utilizando ensayos de ELISA. La **Fig. 1A** muestra la inducción de la expresión de IL-2 por parte de PBMCs, 24 y 48 h después del enfrentamiento. El medio de células A431 y MDA-MB-468 transfectadas con PoliIC/MPPE (0,1 μ g/ml) condujo a que las PBMCs produjeran hasta 165 pg/ml de IL-2. Por el contrario, medio procedente de células U87MG tratadas con PoliIC/MPPE (con una expresión ~ 12 veces menor de EGFR que las células A431 y MDA-MB-468) o células U138MG (sin expresión EGFR) no afectó a las PBMCs. Se obtuvieron resultados similares cuando se examinó la expresión de otras citoquinas: Tanto IFN- γ (**Fig. 1B**) como TNF- α (**Fig. 1C**) fueron inducidos en PBMCs enfrentadas al medio de células A431 y MDA-MB-468, transfectadas con PoliIC/MPPE, pero no de células U87MG transfectadas con PoliIC/MPPE y células U138MG transfectadas con 0,1 μ g/ml de PoliIC/MPPE.

Ejemplo 3 Activación de PBMCs *in vivo*.

La expresión de estas citoquinas selectivamente en tumores que sobre-expresan el EGFR también se confirmó *in vivo* (Tabla 3). Ratones SCID-NOD portadores de tumores subcutáneos que sobre-expresan EGFR en el costado derecho y tumores U138MG en el costado izquierdo fueron tratados por vía intravenosa con 4 inyecciones diarias consecutivas de PoliIC/MPPE seguido de una sola inyección intraperitoneal de cuatro millones de PMBCs. La expresión de, y a concentraciones mucho más altas, en tumores que sobre-expresan el EGFR (**Tabla 3**). Se esperaba que estas citoquinas atrajeran PMBCs selectivamente a los tumores que sobre-expresan el EGFR, en donde se activarían las PMBCs.

Tabla 3 Patrón de expresión de citoquinas *in vivo*

	MDA-MB-468											
	IP10		Gro- α		IF		IL2		IFN γ		TNF α	
PoliIC/MPPE/PBMC	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MD-MB-468	0	218	201	442	0	4	0	151	0	24	0	0,89
U138MG	0	46	322	360	0	0	0	33	0	0	0	0
Sangre	12	81	45	225	0	0	0	52	0	2	0	0

Sangre 3 días	11	89	52	203	0	0	-	-	-	-	-	-
---------------	----	----	----	-----	---	---	---	---	---	---	---	---

A431

5	PolilC/MPPE/PBMC	IP10		Gro- α		IF		IL2		IFN γ		TNF α	
		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	MD-MB-468	16	346	411	870	0	12	0	112	0	38	0	0,74
	U138MG	0	66	240	410	0	0	0	18	0	0	0	0
10	Sangre	22	99	63	263	0	0	0	37	0	6	0	0,12
	Sangre 3 días	34	70	44	294	0	3	-	-	-	-	-	-

Después, los autores de la invención plantearon la cuestión de si la concentración de las citoquinas en los tumores que sobre-expresan el EGFR transfectados con el vector es lo suficientemente alta como para atraer y activar en realidad las células inmunológicas. En un experimento separado, se inyectaron células s.c. en los costados derecho (A431 o MDA-MB-468) e izquierdo (U138MG) de ratones SCID-NOD. Cuando los tumores alcanzaron aprox. 100 mm³ el tratamiento se inició con 3 inyecciones consecutivas I.V. de PolilC/MPPE de 5 µg/ratón/día. 24 h después de la última inyección de PolilC/MPPE, se inyectaron 3 millones de PBMCs I.P. 24 h más tarde se extrajeron los tumores y se fijaron en formalina al 4%. Se prepararon entonces secciones de parafina, se tiñeron con H&E y se sometieron a análisis histopatológico. Las líneas discontinuas en la **Fig. 2** muestran zonas de infiltración de células inmunológicas en las que se detectó la infiltración de las PBMCs en los tumores que sobre-expresan el EGFR de los animales tratados con PolilC/+PBMCs. No se detectó infiltración alguna de células inmunológicas en tumores U138MG, que no sobre-expresan el EGFR.

Se detectaron animales tratados con PolilC/+PBMCs. No se detectó infiltración alguna de células inmunes en tumores U138MG, que no sobre-expresan el EGFR.

EJEMPLO 4 Efecto de espectador mediado por PBMC

La expresión de IFN- γ y TNF- α , potentes citoquinas antitumorales, median en el exterminio espectador directo de células cancerosas transfectadas. La cuestión es entonces, si el nivel de citoquinas es lo suficientemente alto, no sólo para atraer células inmunológicas, sino también para activarlas. Con el fin de examinar los efectos de espectador mediados por PBMC, células A431 o MDA-MB-468 fueron transfectadas primero con PolilC/MPPE y 48 h más tarde PBMCs fueron enfrentadas al medio de las células transfectadas (Métodos). Después de otras 48 h, se añadió medio de las PBMCs enfrentadas a las células recientemente sembradas, no transfectadas (**Fig. 3**). El efecto espectador mediado por PBMC se examinó 24 y 48 h después del intercambio de medio y se comparó con el efecto espectador "directo", mediado por medio de células A431 y MDA-MB-468 tratadas con PolilC/MPPE (**Figs. 3A y 3C**). Ambos efectos de espectador directos y mediados por PBMC se muestran claramente en la Fig. 3. El efecto mediada por PBMC fue particularmente fuerte, exterminando hasta el 90% de las células no transfectadas. Células U138MG, que no expresan EGFR en absoluto, también fueron inhibidas de manera eficiente por los dos tipos de medio (**Figs. 3B y 3D**). No se observó efecto alguno cuando pCI fue reemplazado por el ácido poliglutámico (pGlu), que de manera similar forma partículas con MPPE pero no induce una respuesta inmunológica. Estos resultados sugirieron que la combinación de PolilC/MPPE y PBMC sería sinergia para exterminar con eficacia las células cancerosas.

EJEMPLO 5. PBMCs potencian fuertemente el exterminio de células cancerosas PolilC/MPPE in vitro

Para examinar el efecto sinérgico del exterminio del cáncer, células tumorales (cultivados tal como se describe en Métodos) fueron transfectadas con PolilC/MPPE a una dosis baja (0,1 µg/ml). 24 h más tarde, 500.000 PBMCs/pocillo se añadieron a las células cancerosas y se co-incubaron durante otras 24 h, seguido de la adición de PBMCs (**Fig. 4**). Para distinguir las células tumorales de PBMCs, las células tumorales se marcaron con anticuerpo EGFR conjugado con FITC (Fluorescencia verde). Se detectaron células tumorales sometidas a la apoptosis con un kit de Anexina-V-Biotina, Biosource Inc. (Fluorescencia roja). Las células tratadas con PolilC/MPPE solo o PBMCs solas mostraron una señal apoptótica muy débil. Por el contrario, se obtuvo una intensa señal apoptótica cuando las células que sobre-expresan EGFR fueron tratadas tanto con PolilC/MPPE como PBMCs (**Fig. 4A, B**). Células

U138MG no se sometieron a una apoptosis detectable (**Fig. 4C**). Por lo tanto, la adición de PBMCs a células tumorales tratadas con PolilC/MPPE potencia fuertemente la apoptosis de células tumorales.

EJEMPLO 6 Aplicación sistémica de PolilC/MPPE combinado con PBMCs cura ratones con tumores diseminados

A la vista de la anterior conclusión de los autores de la invención de que el vector dirigido al EGFR cargado con PolilC no tenía efectos tóxicos sobre las células del cerebro normales en cultivo de tejidos o in vivo (Shir et al., 2006), se examinó si PolilC/MPPE dirigido al EGFR podría aplicarse sistémicamente, para el tratamiento de tumores diseminados que sobre-expresan el EGFR *in vivo*. En ausencia de un modelo de ratón de los tumores que sobre-expresan el EGFR, los autores de la invención inyectaron i.v. 2 millones de células A431 o MDA-MB-468 humanas en ratones SCID-NOD tal como se describe en Métodos. Diez días después de la inyección de las células, se inició el tratamiento con dos ciclos de 3 días y un ciclo de 4 días de inyecciones diarias de 20 µg de PolilC/MPPE, con un intervalo de 24 horas entre cada ciclo (es decir, un total de 10 inyecciones, repartidas en 12 días). Este procedimiento eliminó los efectos tóxicos del tratamiento tal como la pérdida de peso (datos no mostrados). Ratones portadores de tumores A431 que recibieron PolilC/MPPE sobrevivieron al menos 3 veces más que los ratones no tratados y tres ratones se curaron por completo (**Fig. 5D**). Ratones portadores de tumores MDA-MB-468, tratados con PolilC/MPPE sobrevivieron hasta el doble de tiempo que los ratones no tratados (**Fig. 5E**).

Estos resultados, combinados con el hallazgo de que las PBMCs potencian fuertemente el efecto de PolilC/MPPE in vitro, animaron a los autores de la invención a examinar si las PBMCs potenciarían de manera similar el efecto de PolilC/MPPE in vivo. Para estos experimentos, esperaron 15 días después de la inyección de células A431 o MDA-MB-468 en ratones SCID-NOD, momento en el cual tumores grandes de hasta 500 µm pueden ser detectados en los pulmones (**Fig. 5**). Los ratones fueron tratados entonces con 4 inyecciones intravenosas consecutivas, diarias de 20 µg de PolilC/MPPE. Los grupos control incluían ratones tratados con pGlu/MPPE (ácido poliglutámico/MPPE) para determinar el efecto del conjugado sin PolilC. 24 h después de la inyección final de PolilC, se inyectó a los ratones una vez cuatro millones de PBMC humana. La "reconstitución" del sistema inmunológico de ratón SCID-NOD utilizando PBMCs humanas es una práctica común. Al igual que en el experimento anterior, ratones tratados con PolilC-MPPE portadores de tumores A431 sobrevivieron más tiempo que los ratones no tratados. Los ratones que fueron tratados tanto con PolilC-MPPE como con PBMCs humanas sobrevivieron durante más de un año, y no mostraron signo alguno de tumores (**Fig. 5B**). De manera similar, ratones portadores de tumores MDA-MB-468 tratados con PolilC/MPPE solo sobrevivieron hasta el doble de tiempo que ratones sin tratar, mientras que los ratones tratados tanto con PolilC/MPPE y PBMCs sobrevivieron más de un año y no mostraron signo alguno de tumores (**Fig. 5C**). No se observó toxicidad significativa alguna, reducción en el peso o comportamiento anormal ya sea durante el tratamiento o después del mismo. Por lo tanto, mediante la introducción de PBMCs humanas, los autores de la invención han sido capaces de reducir significativamente la dosificación de PolilC/MPPE y de eliminar tumores diseminados establecidos. Por lo tanto, las PBMCs juegan un papel crucial en la erradicación de tumores.

EJEMPLO 7 Comparación de los vectores de segunda generación con los vectores de primera generación

Los vectores de segunda generación avanzada proporcionados por la presente invención, en esta memoria denominados pIC/P₂₂₁PE y pIC/P₂₂₁PGE11, se componen de PolilC complejo con los conjugados P₂₂₁PE y P₂₂₁PGE11, respectivamente. Estos conjugados comprenden polietilenimina lineal, PEG y EGF o el péptido GE11, en lugar de la polietilenimina ramificada en el conjugado MPPE de los vectores de primera generación, y son significativamente más sencillos de producir, se pueden hacer en lotes más grandes y más uniformes, y los vectores resultantes exhiben actividad de exterminio de células cancerosas mejorada a la de los vectores de primera generación.

7.1 Preparación de los nuevos conjugados P₂₂₁PE y P₂₂₁PGE11

Para la síntesis de los nuevos conjugados se utilizó PEG bifuncional (NHS-PEG2k-OPSS, de Nektar Therapeutics, EE.UU.); PEGila PEI lineal en un extremo y se acopla con HS-mEGF o HS-GE11 en el extremo distal a través del resto OPSS (disulfuro de orto-piridilo) a través de un puente disulfuro. Este simple procedimiento de dos etapas evita el régimen tedioso de purificación empleado para la síntesis de MPPE (véase Métodos, punto (ii), anteriormente en esta memoria), resultando un rendimiento global mucho mayor.

El péptido GE11 puede sintetizarse, ya sea mediante métodos recombinantes bien conocidos en la técnica o se puede sintetizar utilizando técnicas de síntesis química bien conocidas, p. ej., mediante el uso de un sintetizador automático (disponible de, p. ej., Applied Biosystems, Alemania), p. ej., utilizando los protocolos de la compañía para la técnica de t-butiloxycarbonilo (t-Boc). La purificación puede realizarse mediante HPLC en fase inversa.

Los vectores pIC/P₂₂₁PE (pIC/PPE) y pIC/P₂₂₁PGE11 (pIC.PPGE) se obtienen mezclando polilC con el conjugado PPE o PPGE11.

7.2 Comparación de vectores de primera y segunda generación *in vitro*.

Dado que la sensibilidad de las células a los vectores de la invención es una función de su nivel de expresión del EGFR, era interesante evaluar la capacidad de los diferentes vectores para exterminar células que tienen diferentes niveles de expresión del EGFR. Para este propósito, 3000 células de U138MG y 4000 células de cada una de las otras líneas celulares mostradas en la Tabla 4 se sembraron en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante la noche. Las células fueron transfectadas con pIC formulado con el conjugado indicado. La supervivencia de las células se analizó mediante el ensayo de azul de metileno 48 h después de la transfección. La Tabla 4 muestra las células utilizadas y el nivel de expresión del EGFR:

Tabla 4. Líneas celulares utilizadas y su nivel de expresión del EGFR

Línea celular	Moléculas/célula del receptor de EGF
U138MG	-
MCF7	$0.8-5 \times 10^3$
U87MG	1×10^5
MDA-MB-231 (MDA231)	$3-7 \times 10^5$
U87MGwtEGFR	1×10^6
MDA-MB-468 (MDA468)	2×10^6

Como puede verse en la **Fig. 6**, el nuevo vector de segunda generación pIC/P₂₂₁PE tiene un efecto algo más intenso sobre las células con alta expresión de EGFR (MDA-MB-468) y el efecto significativamente más intenso en células con una menor expresión de EGFR (U87MG) que el vector de primera generación pIC/MPPE. Por lo tanto, pIC/P₂₂₁PE debería ser significativamente más beneficioso en los tumores con una expresión relativamente menor de EGFR.

7.3 Comparación de PPE con PPGE11 *in vitro*.

La capacidad de exterminio celular del vector pIC/P₂₂₁PGE11, que tiene un péptido de unión a EGFR en vez de EGF como el resto de dirección, se comparó con la de pIC/P₂₂₁PE. Tal como se observa en la **Fig. 7**, P₂₂₁PE era altamente eficiente, exterminando hasta el 90% de las células MDA-MB-468 a tan sólo 0,01 µg/ml de pIC. No se observó efecto alguno sobre las células con baja o ninguna expresión de EGFR a esta concentración de pIC. pIC/P₂₂₁PGE11 era algo menos eficaz. Sin embargo, hasta el 80% de las células MDA-MB468 podía ser exterminado por parte de pIC/PPGE11 a 0,1 µg/ml con un efecto mínimo sobre las células de control.

7.4 Eficacia de vectores de primera y segunda generación *in vivo*.

La eficacia de pIC/P₂₂₁PE y pIC/MPPE se comparó además *in vivo*. A ratones hembra se les inyectaron s.c. 2 millones de células A431 disueltas en PBS. Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de aproximadamente 75-80 mm³, los ratones se dividieron en 5 grupos. pIC formulado con el conjugado indicado se inyectó IV cada 48 h. pIC/PPE mostró una eficacia incluso mayor que pIC/MPPE en la inhibición del crecimiento del tumor A431(**Fig. 8A**), y pIC/PPE conservó su selectividad como puede verse a partir de la falta de influencia en el crecimiento de tumores U138MG (que no expresan EGFR), incluso a dosis altas (**Fig. 8B**).

REFERENCIAS

- Butowski N, et al. (2009) A phase II clinical trial of poly-ICLC with radiation for adult patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma: a North American Brain Tumor Consortium (NABTC01-05). J Neurooncol 91:175-82.
- Ciceri F, et al. (2007) Antitumor effects of HSV-TK-engineered donor lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation. Blood 109:4698-707.
- Fujimura T, Nakagawa S, Ohtani T, Ito Y, Aiba S (2006) Inhibitory effect of the polyinosinic-polycytidylic acid/cationic liposome on the progression of murine B16F10 melanoma. Eur J Immunol 36:3371-80.
- Hynes NE, MacDonald G (2009) ErbB receptors and signaling pathways in cancer. Curr Opin Cell Biol 21:177-84.

Li, Z. et al. (2005) Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics, FASEB J. 19:1978-85.

Rosenberg SA (2008) Overcoming obstacles to the effective immunotherapy of human cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 105:12643-4.

- 5 Salazar AM, et al. (1996) Long-term treatment of malignant gliomas with intramuscularly administered polyinosinicpolycytidylic acid stabilized with polylysine and carboxymethylcellulose: an open pilot study. Neurosurgery 38:1096-103; discussion 1103-4.

Shir A, Ogris M, Wagner E, Levitzki A (2006) EGF receptor-targeted synthetic double-stranded RNA eliminates glioblastoma, breast cancer, and adenocarcinoma tumors in mice. PLoS Med 3:e6.

- 10 Song ,S. et al. (2008) Peptide ligand-mediated liposome distribution and targeting to EGFR expressing tumors in vivo, Int J Pharmaceuticals 363: 155-161.

REIVINDICACIONES

1. Un vector dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que comprende una molécula de ARN de doble cadena (ARNds) con un péptido o polipéptido de unión al EGFR, para uso en el tratamiento del cáncer caracterizado por células que sobre-expresan el EGFR, en donde dicho tratamiento comprende una administración concomitante o secuencial de células inmunológicas, y en donde dichas células inmunológicas se seleccionan de células T infiltrantes de tumores (T-TILs), células T modificadas específicas para tumores y células mononucleares de sangre periférica (PBMcs).
2. Una composición farmacéutica que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y un vector dirigido al EGFR que comprende una molécula de ARN de doble cadena (ARNds) con un péptido o polipéptido de unión al EGFR, para uso en el tratamiento del cáncer caracterizado por células que sobre-expresan el EGFR, en donde dicho tratamiento comprende una administración concomitante o secuencial de células inmunológicas, y en donde dichas células inmunológicas se seleccionan de células T infiltrantes de tumores (T-TILs), células T modificadas específicas para tumores y células mononucleares de sangre periférica (PBMcs).
3. El vector dirigido al EGFR para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la molécula de ARNds está compuesta de una cadena de ácido poliinosínico y una cadena de ácido policitidílico (poli IC) que tiene al menos 22 ribonucleótidos en cada una de las cadenas, preferiblemente 85-300 ribonucleótidos en cada una de las cadenas.
4. El vector dirigido al EGFR para uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 3 o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, que comprende, además, un soporte de ARNds tal como un polímero policatiónico, preferiblemente polietilenimina o poli-L-lisina; y/o un polímero no iónico soluble en agua, preferiblemente poli(etilenglicol) (PEG).
5. El vector dirigido al EGFR para uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha molécula de ARNds está unida de forma no covalente a dicho soporte de ARNds.
6. El vector dirigido al EGFR para uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho soporte de ARNds es polietilenimina unida de forma covalente a PEG.
7. El vector dirigido al EGFR para uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho péptido o polipéptido de unión al EGFR está unido de forma covalente a dicho soporte de ARNds.
8. El vector dirigido al EGFR para uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho polipéptido de unión al EGFR es EGF.
9. El vector dirigido al EGFR para uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende, además, un compuesto capaz de facilitar la degradación de una membrana endosomal, preferiblemente melitina.
10. El vector dirigido al EGFR para uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 4, seleccionado de los vectores poliIC/melitina-polietilenimina ramificada-polietilenglicol-mEGF (pIC/MPPE), poliIC/polietilenimina lineal-polietilenglicol-mEGF (pIC/PPE) o poliIC/polietilenimina lineal-polietilenglicol-péptido GE11 (pIC/PPGE11).
11. El vector dirigido al EGFR para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10 o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en donde dicho vector y dichas células inmunológicas se han de administrar preferiblemente de forma secuencial.
12. El vector dirigido al EGFR para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11 o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11, en donde dicho cáncer se selecciona de carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, glioblastoma, carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas, cáncer colorrectal, adenocarcinoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga y cáncer de próstata.
13. El vector dirigido al EGFR para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12 o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12, en donde dicho vector se formula para la administración sistémica.

Fig. 1A

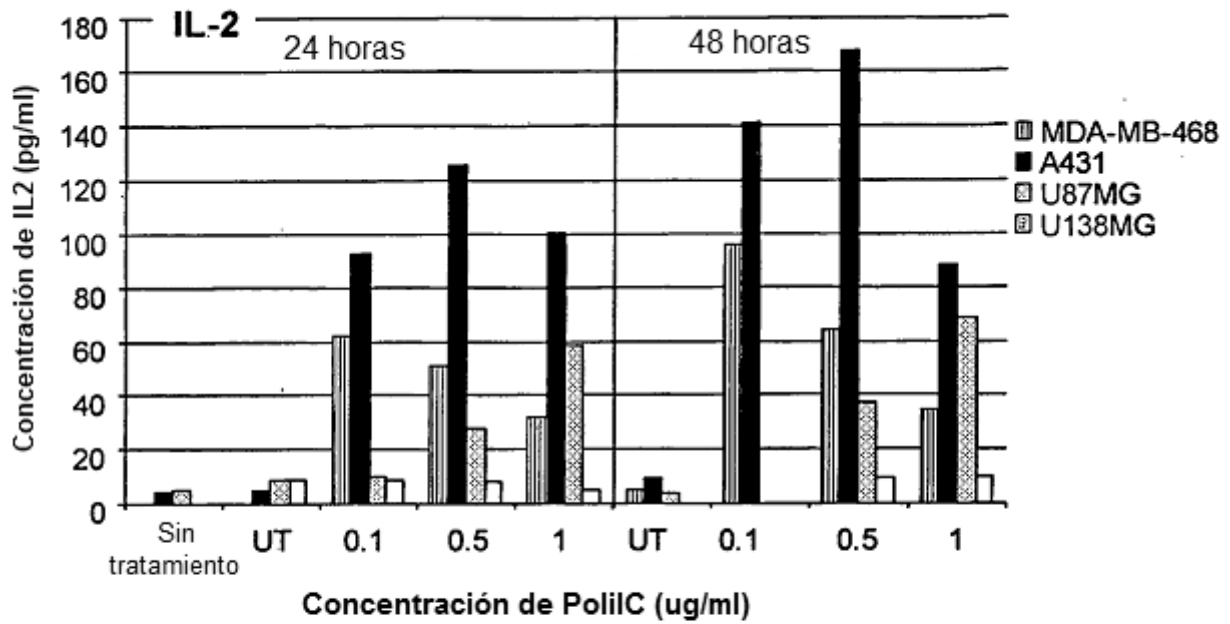


Fig. 1B

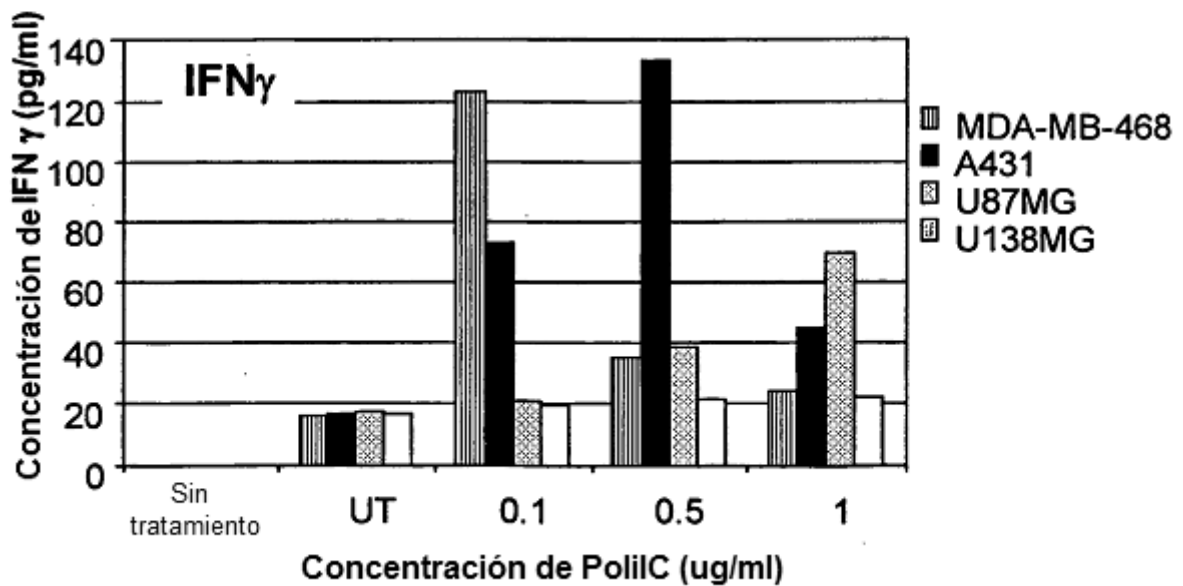


Fig. 1C

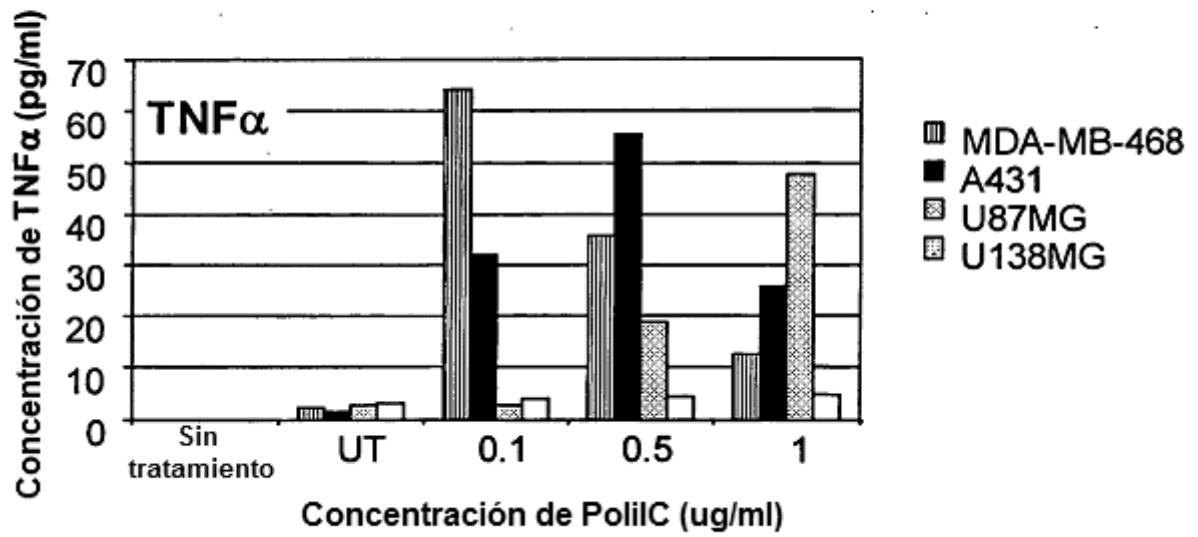


Fig. 2A

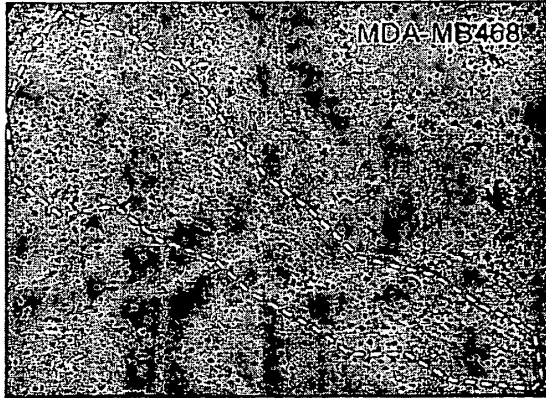


Fig. 2B

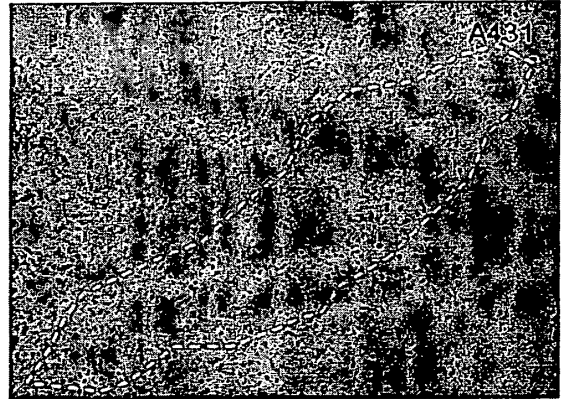


Fig. 2C

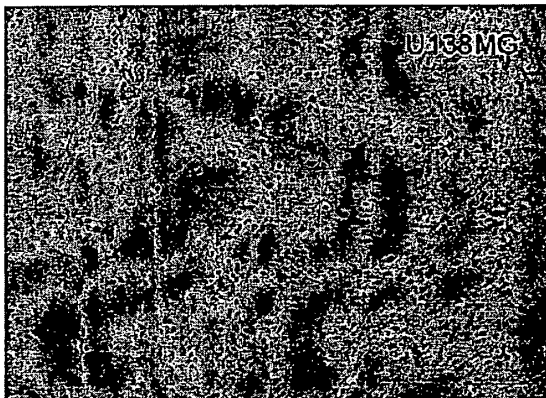


Fig. 2D

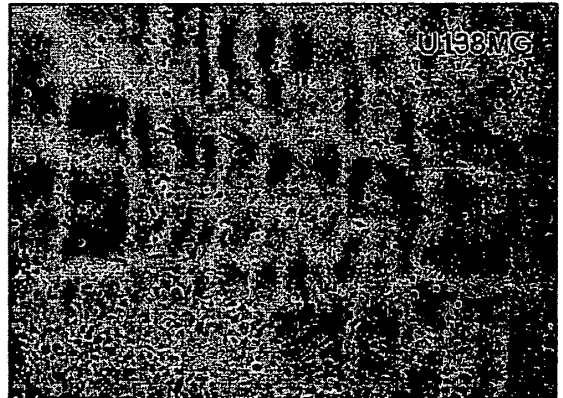


Fig. 3A

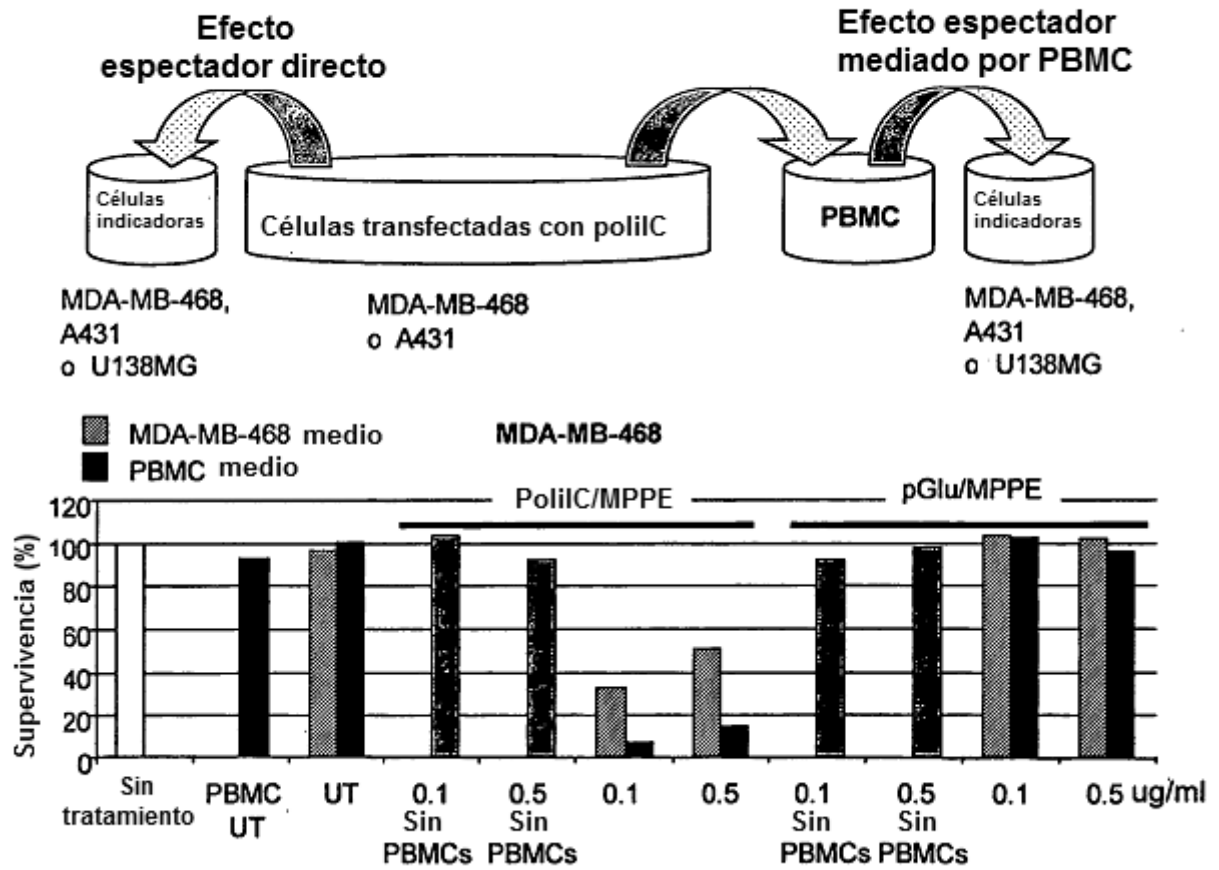


Fig. 3B

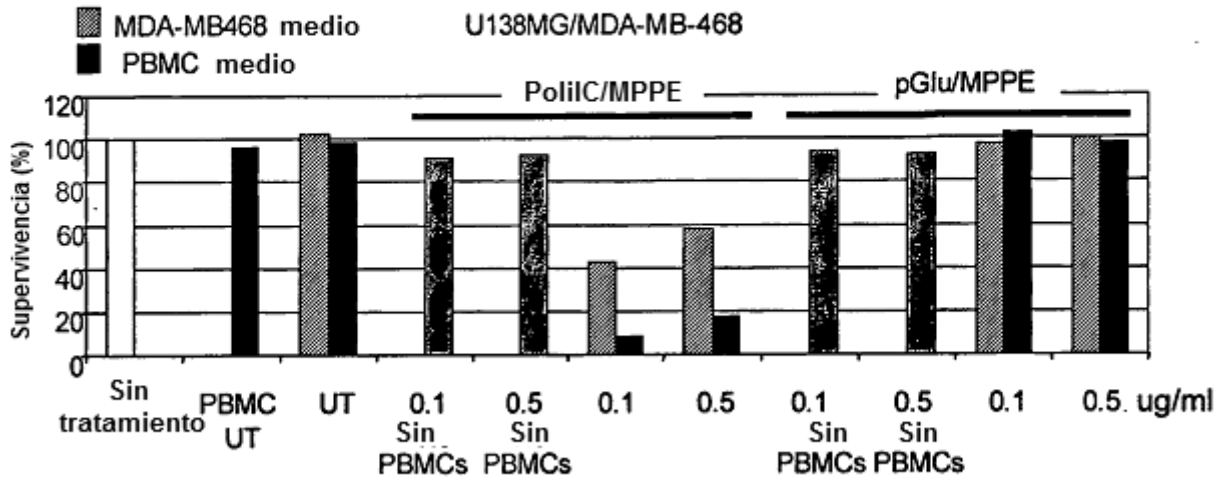


Fig. 3C

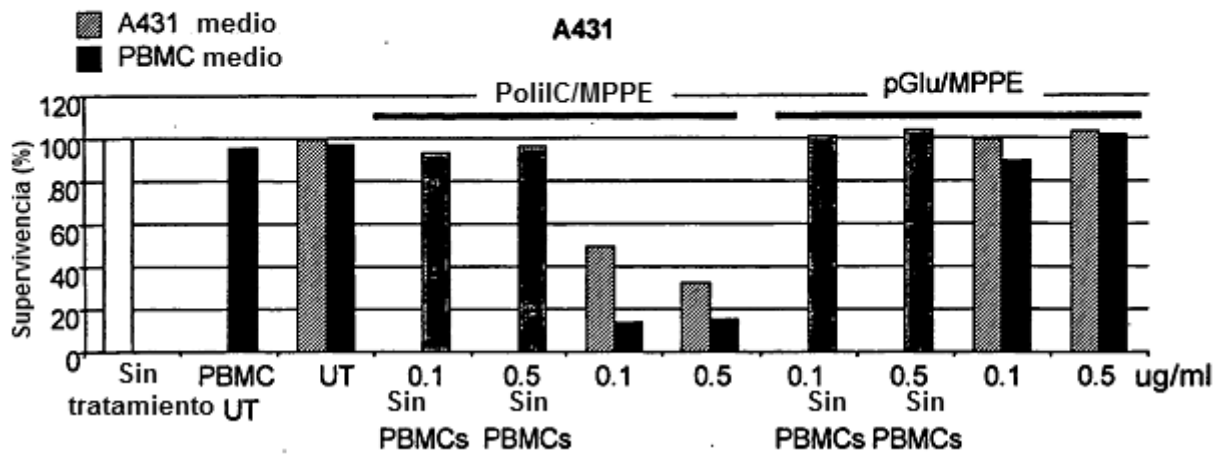


Fig. 3D

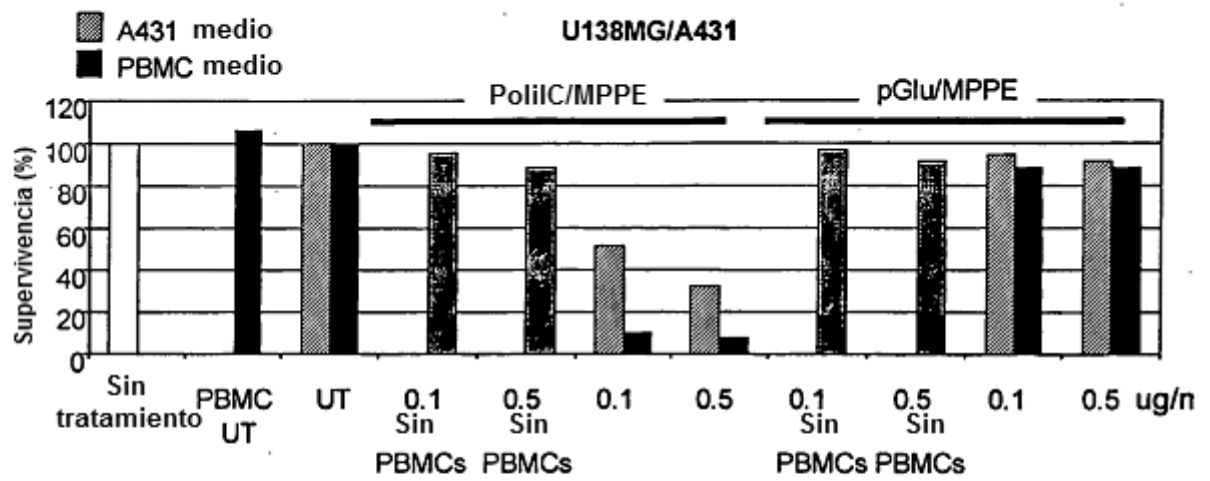


Fig. 4A

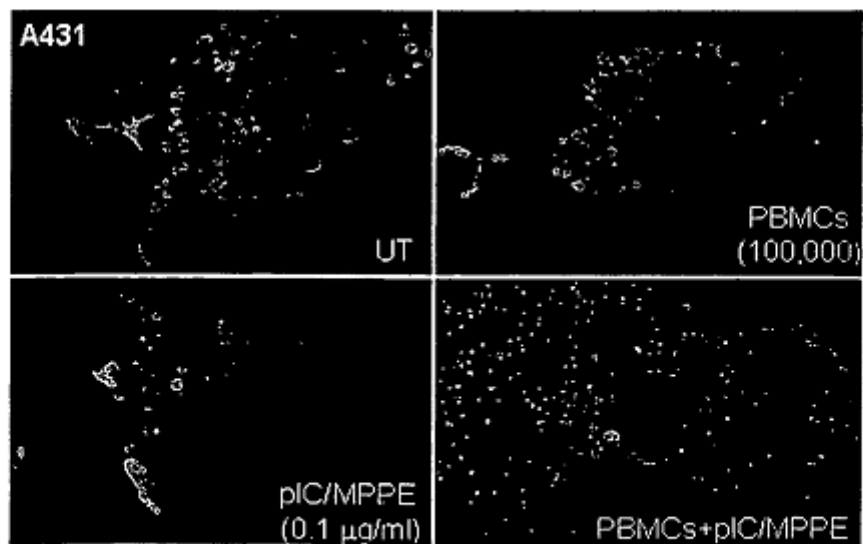


Fig. 4B

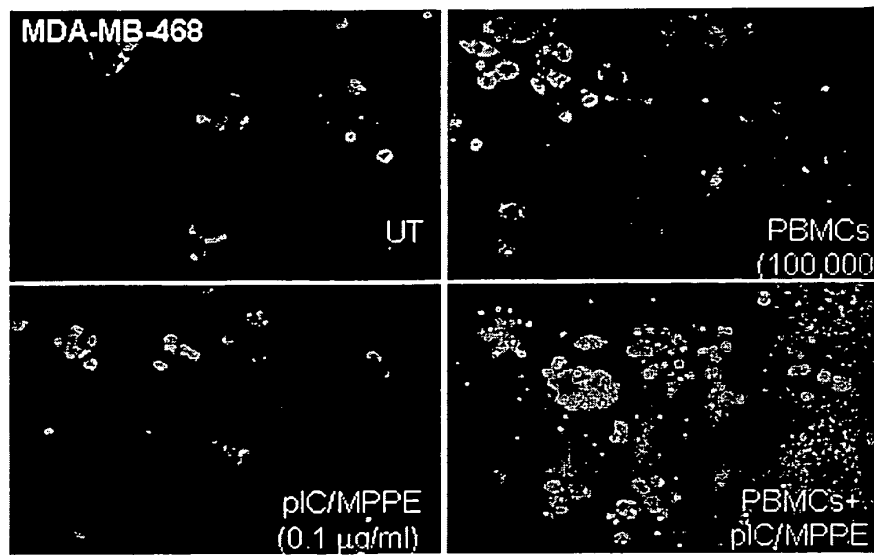


Fig. 4C

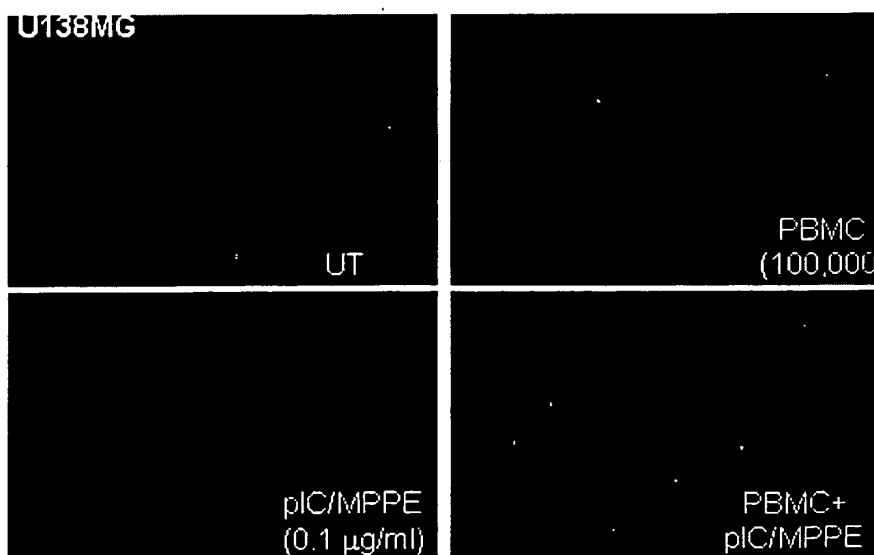


Fig. 5A

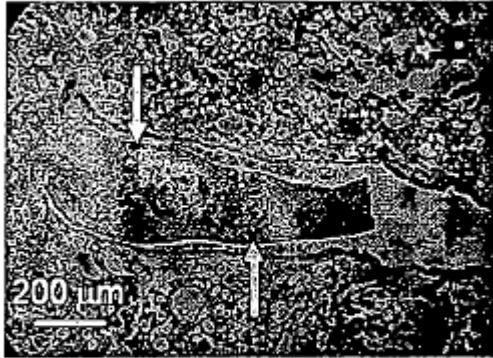


Fig. 5B

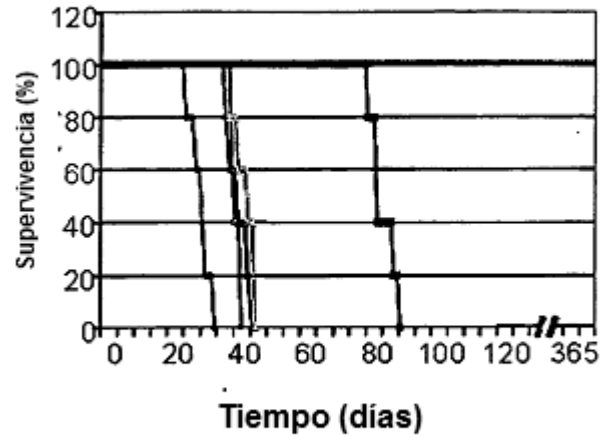


Fig. 5C

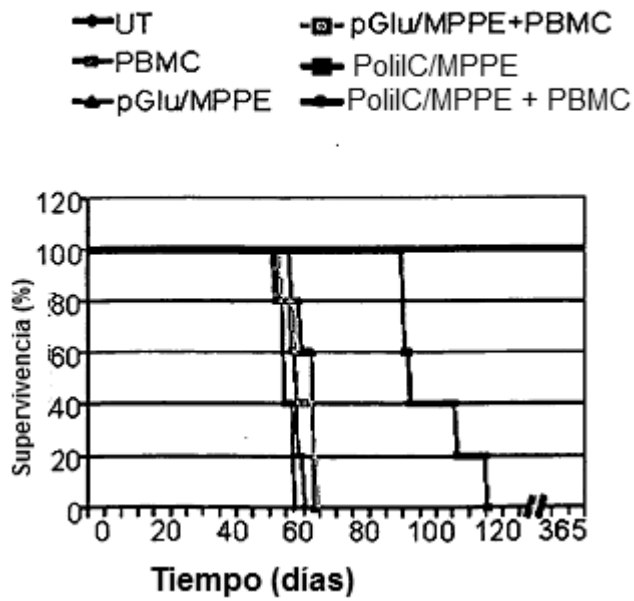


Fig. 5D

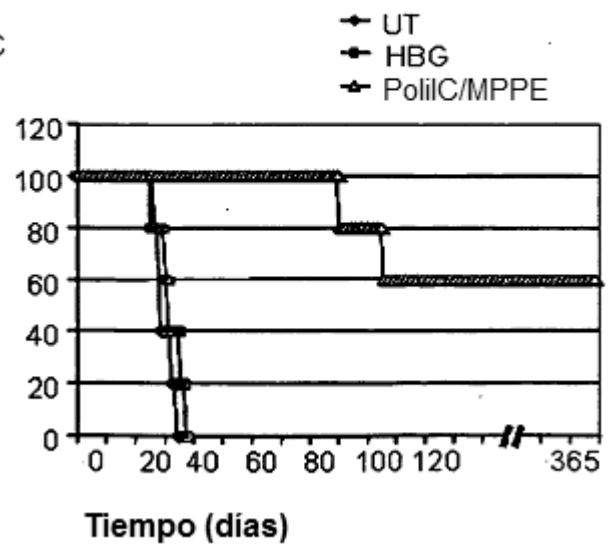


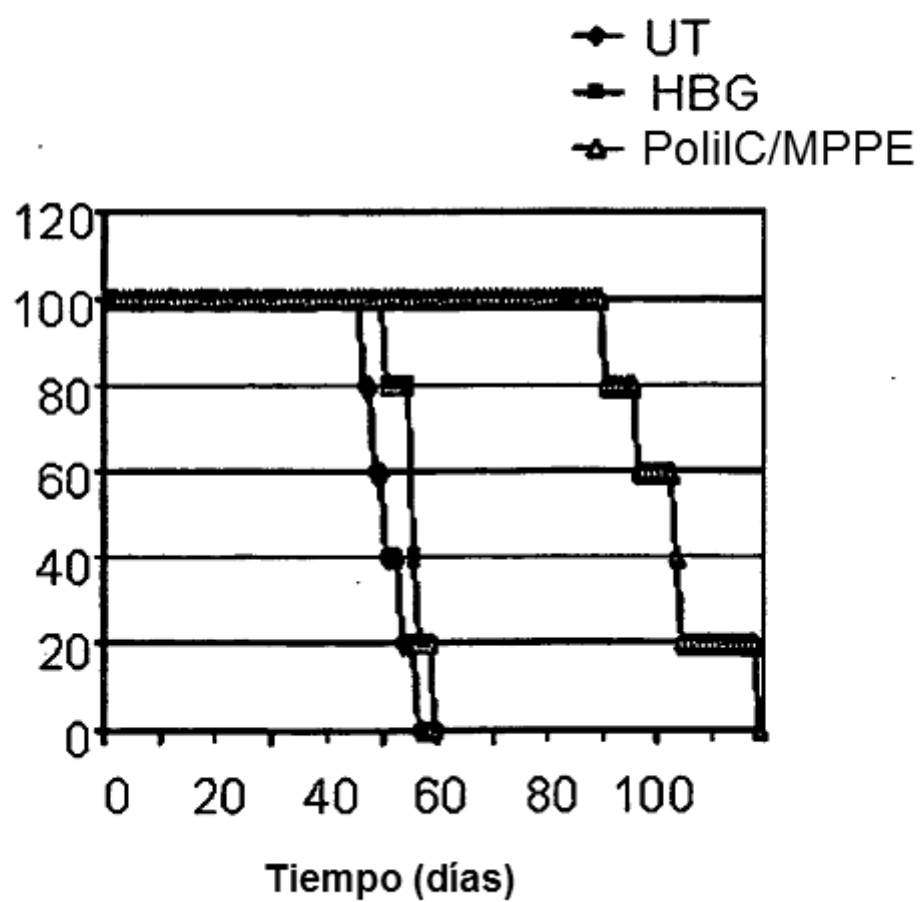
Fig. 5E

Fig. 6

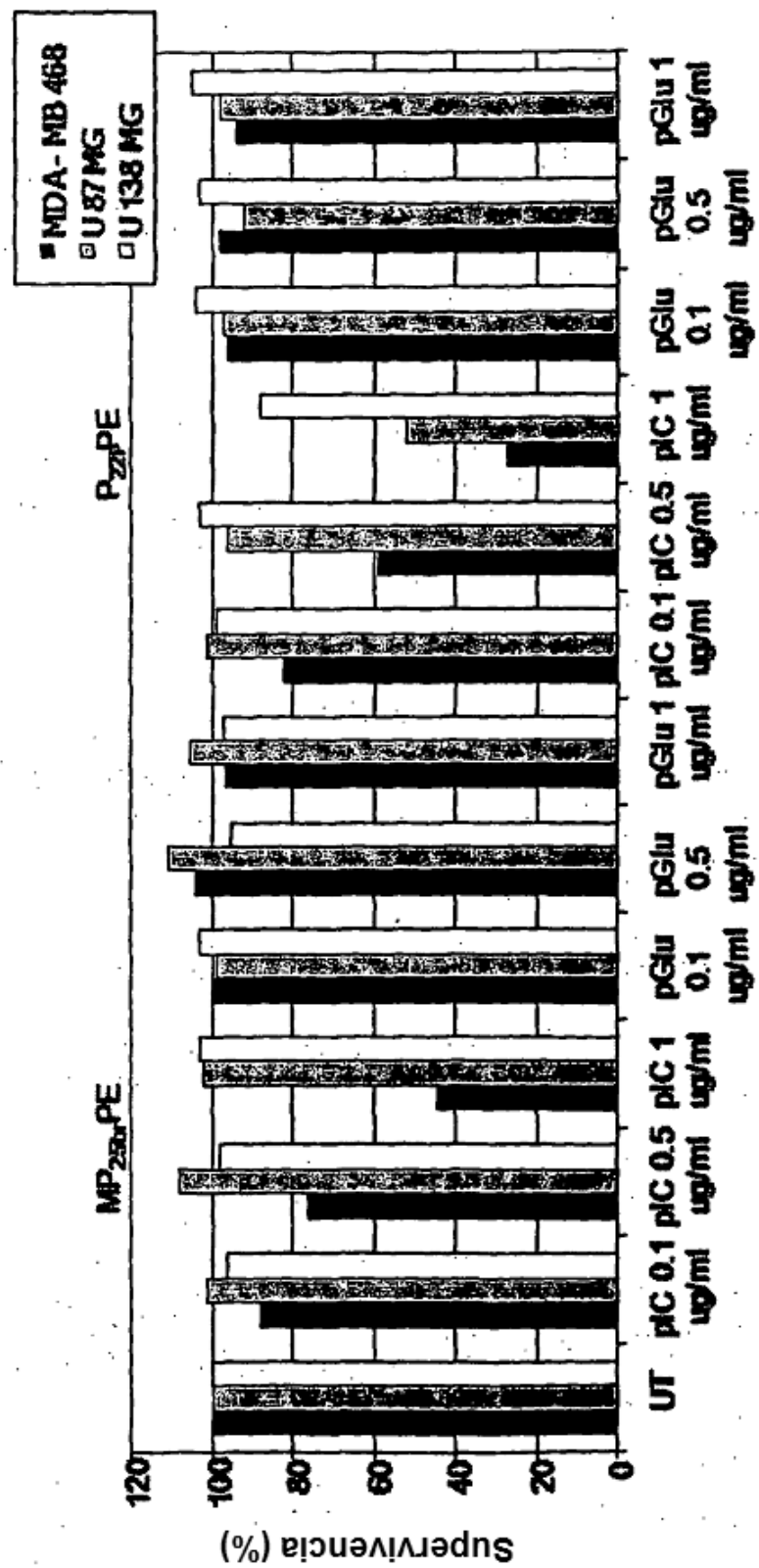


Fig. 7

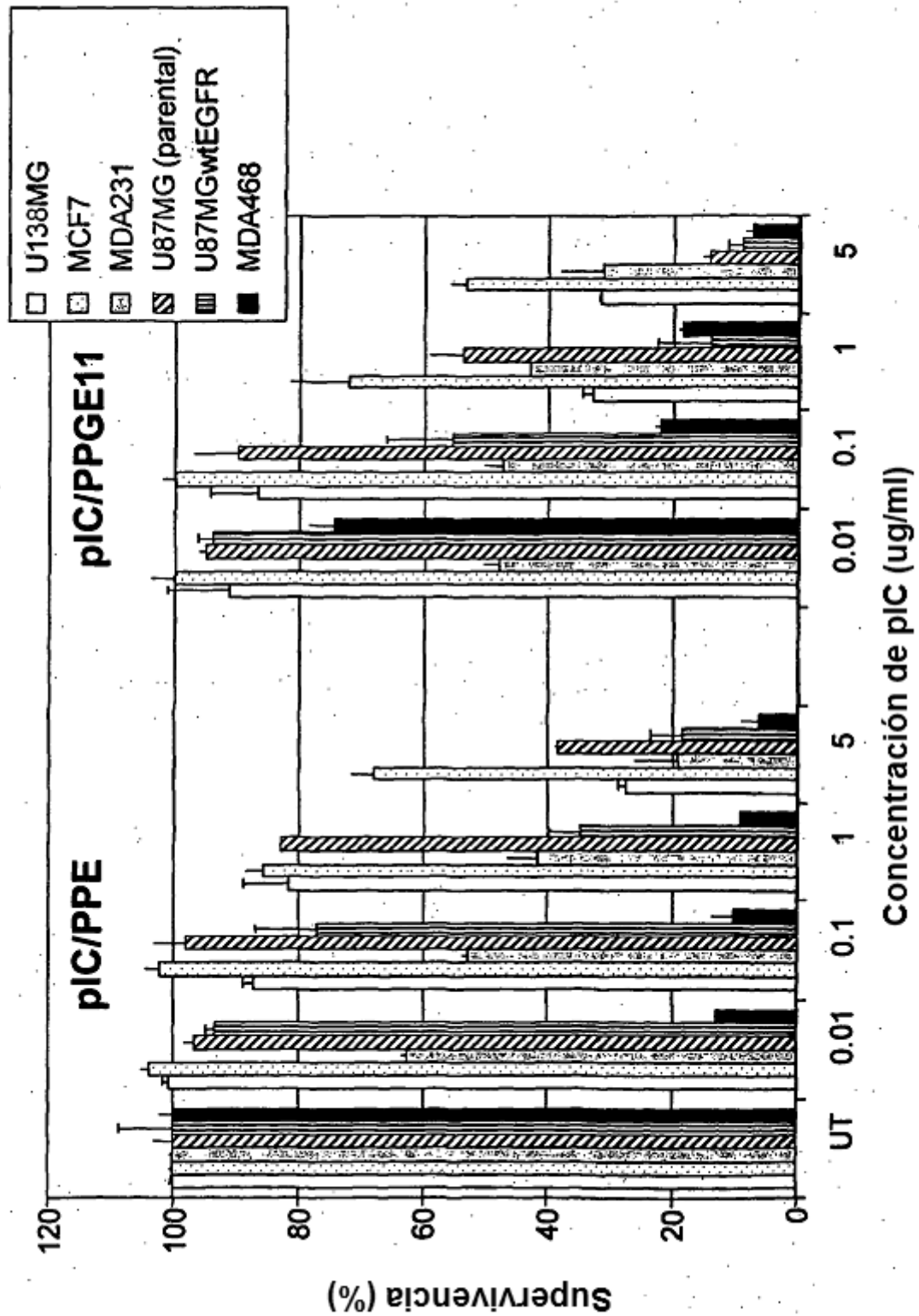


Fig. 8A

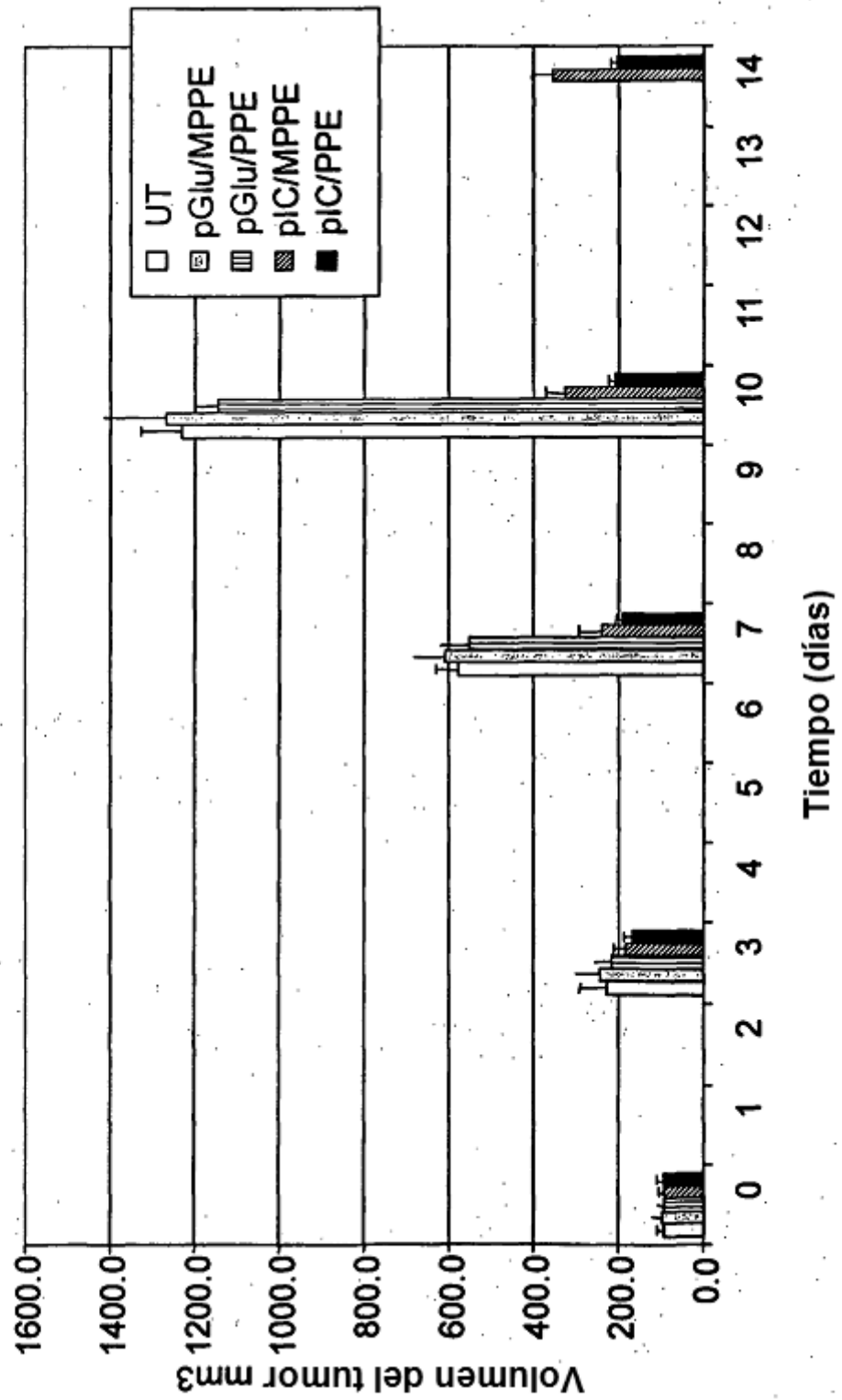


Fig. 8B

