

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 598**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2009 PCT/US2009/032029**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2009 WO2009094647**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2009 E 09703365 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2245464**

54 Título: **Biomarcadores de P53**

30 Prioridad:

**25.01.2008 US 23736 P**

**22.02.2008 US 30874 P**

**11.04.2008 US 44373 P**

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

**19.06.2017**

73 Titular/es:

**MULTIVIR INC. (100.0%)  
2 Houston Center 909 Fannin, Suite 2100  
Houston, TX 77010-1028, US**

72 Inventor/es:

**SOBOL, ROBERT, E. y  
MENANDER, KERSTIN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 617 598 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

Biomarcadores de P53

5 **Antecedentes de la invención****I. Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere en general a los campos de oncología y terapia de cáncer. Más particularmente, se refiere a la evaluación de factores para predecir la eficacia de una terapia contra enfermedades hiperproliferativas.

**II. Descripción de la técnica relacionada**

15 El cáncer es una causa principal de muerte en la mayoría de los países, y produce miles de millones de dólares en gastos sanitarios en todo el mundo. Está bien establecido ahora que una diversidad de cánceres están provocados, al menos en parte, por anomalías genéticas que dan como resultado la sobreexpresión de genes que provocan cáncer, denominados "oncogenes", o por mutaciones de pérdida de función en genes protectores, denominados con frecuencia genes "supresores de tumores". Un ejemplo es p53, una fosfoproteína nuclear de 53 kD que controla la proliferación celular. Las mutaciones del gen de p53 y pérdida alélica en el cromosoma 17p, en el que se localiza este gen, están entre las alteraciones más frecuentes identificadas en tumores malignos humanos. La proteína p53 está altamente conservada a lo largo de la evolución y se expresa, aunque a bajos niveles, en la mayoría de tejidos normales. Se ha mostrado que p53 de tipo silvestre está implicada en el control del ciclo celular (Mercer, 1992), la regulación transcripcional (Fields y Jang, 1990; Mietz *et al.*, 1992), replicación de ADN (Wilcock y Lane, 1991; Bargonetti *et al.*, 1991) e inducción de apoptosis (Yonish-Rouach *et al.*, 1991; Shaw *et al.*, 1992).

25 Se conocen diversos alelos de p53 mutantes en los que una sustitución de una única base da como resultado la síntesis de proteínas que tienen propiedades reguladoras del crecimiento bastante diferentes y, en última instancia, conducen a tumores malignos (Hollstein *et al.*, 1991). De hecho, se ha descubierto que el gen de p53 es el gen más frecuentemente mutado en cánceres humanos comunes (Hollstein *et al.*, 1991; Weinberg, 1991), y la mutación de p53 está particularmente asociada con los cánceres ligados al humo de cigarrillos (Hollstein *et al.*, 1991; Zakut-Houri *et al.*, 1985). La sobreexpresión de p53 en tumores de mama también se ha documentado (Casey *et al.*, 1991). Resulta interesante, sin embargo, que los efectos beneficiosos de p53 no se limitan a cánceres que contienen moléculas de p53 mutadas. En una serie de artículos, Clayman *et al.* (1995) demostraron que el crecimiento de células cancerosas que expresan moléculas de p53 de tipo silvestre también estaba inhibido por la expresión de p53 de un vector viral.

30 Como resultado de estos hallazgos, se ha realizado un esfuerzo considerable en la terapia génica de p53. Se ha informado de suministro retroviral de p53 a seres humanos hace algún tiempo (Roth *et al.*, 1996). Allí se usó un vector retroviral que contenía el gen de p53 de tipo silvestre bajo el control de un promotor de beta-actina para mediar la transferencia de p53 de tipo silvestre a 9 pacientes humanos con cánceres de pulmón no microcíticos mediante inyección directa. No se observó ningún efecto tóxico relacionado con el vector clínicamente significativo hasta cinco meses después del tratamiento. La hibridación *in situ* y reacción en cadena de la ADN polimerasa mostraron secuencias de vector-p53 en biopsias postratamiento. La apoptosis (muerte celular programada) fue más frecuente en biopsias postratamiento que en biopsias pretratamiento. Se observó regresión tumoral en tres pacientes, y el crecimiento tumoral se estabilizó en otros tres pacientes. Se han realizado estudios similares usando adenovirus para suministrar p53 a pacientes humanos con carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello (SCCHN) (Clayman *et al.*, 1998). Las morbilidades relacionadas con transferencia génica y quirúrgica fueron mínimas, y los resultados generales proporcionaron apoyo preliminar para el uso de transferencia génica de Ad-p53 como un adyuvante quirúrgico en pacientes con SCCHN avanzado.

40 Los avances en el entendimiento del papel crítico de la función de p53 anómala en la proliferación tumoral y la resistencia al tratamiento proporcionaron la base para desarrollar terapias génicas de p53 para SCCHN y otros cánceres (Hartwell y Kastan, 1994; Kastan *et al.*, 1995; Edelman y Nemunaitis, 2003; Ahomadegbe *et al.*, 1995; Ganly *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1995; Clayman *et al.*, 1995; Clayman *et al.*, 1998; Clayman *et al.*, 1999; Swisher *et al.*, 1999; Nemunaitis *et al.*, 2000; Peng, 2005). Por ejemplo, Advexin™ (Ad5CMV-p53, INGN 201) consta de un vector de adenovirus incompetente para replicación de tipo 5 que contiene el gen supresor de tumores p53 normal como su componente terapéutico.

50 Sin embargo, a pesar de los éxitos de la terapia génica, no está claro en la actualidad por qué algunos pacientes responden a p53 y otras terapias mientras que otros no. Sigue existiendo la necesidad de identificar subconjuntos de pacientes específicos que se beneficiarán más de este tratamiento.

55 Se han identificado varios factores de pronóstico clínico que influyen en la respuesta a una terapia y supervivencia en pacientes con SCCHN recurrente (Argiris *et al.*, 2004; Pivot *et al.*, 2001; Recondo *et al.*, 1991). Se han usado más recientemente biomarcadores moleculares para predecir el pronóstico. Sin embargo, con respecto al uso de biomarcadores de p53 para predecir el pronóstico, el campo se caracteriza por datos conflictivos, indicando algunos

estudios la capacidad de los biomarcadores de p53 para predecir resultados (Recondo *et al.*, 1991; Gallo *et al.*, 1995; Mulder *et al.*, 1995; Sarkis *et al.*, 1995; Sauter *et al.*, 1995; Stenmark-Askmal *et al.*, 1995; Matsumura *et al.*, 1996; McKaig *et al.*, 1998; Nemunaitis *et al.*, 1991) mientras que otros indican que los biomarcadores de p53 no predicen resultados de pacientes (Kyzas *et al.*, 2005). De hecho, uno de los mayores estudios en cánceres de cabeza y cuello, un metaanálisis que combinaba los resultados de 42 estudios que implicaban a 3.388 pacientes no reveló ninguna correlación estadísticamente significativa entre el estado de biomarcadores de p53 y el resultado clínico (Kyzas *et al.*, 2005).

Menander *et al.* (2007) desvela un método *in vitro* para predecir una respuesta a terapia génica de p53 para un sujeto humano que tiene un tumor, que comprende determinar si células tumorales de dicho tumor expresan proteína p53 a un nivel que es mayor que el expresado en células no tumorales que expresan p53 normales y en el que si se descubre que dichas células tumorales expresan proteína p53 a niveles mayores que el expresado por células normales que expresan p53 normal, entonces esto es indicativo de una respuesta favorable a dicha terapia. St John *et al.* (2000) desvelan que las células tumorales que sobreexpresan una proteína p53 mutada son sensibles a la terapia génica de p53 a alta dosis mientras que una supresión de p53 conduce a una respuesta escasa a terapia génica de p53.

Por lo tanto, existe la necesidad de definir apropiadamente perfiles de biomarcadores de p53 capaces de realizar una predicción más fiable del resultado de los pacientes para guiar el uso apropiado de las terapias actuales y para evaluar la eficacia de nuevos tratamientos.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Por lo tanto, se refiere a los siguientes artículos:

1. Un método *in vitro* para predecir una respuesta favorable o insuficiente a terapia génica de p53 para un sujeto humano que tiene un tumor que comprende:

(a) determinar si las células tumorales de dicho tumor tienen un gen de p53 mutado; y  
(b) determinar si las células tumorales de dicho tumor expresan proteína p53 a un nivel que es mayor que el expresado en células no tumorales que expresan p53 normal;

(i) en el que si se descubre que dichas células tumorales expresan una proteína p53 mutante a niveles mayores que el expresado por células normales que expresan p53 normal, en el que la mutación en el gen de p53 es una mutación negativa dominante de bloqueo y en el que dicho p53 mutado es capaz de unirse con e inactivar una proteína p53 normal, entonces esto es indicativo de una respuesta insuficiente a dicha terapia y

(ii) en el que si se descubre que dichas células tumorales expresan una proteína p53 mutante a niveles mayores que los expresados por células normales que expresan p53 normal y en el que la proteína p53 mutante no se une ni inactiva proteína p53 normal, entonces, esto es indicativo de una respuesta favorable a dicha terapia;

(iii) en el que si se descubre que dichas células tumorales no expresan una proteína p53 mutante a niveles que son mayores que los expresados por células normales que expresan p53 normal, entonces esto es indicativo de una respuesta favorable a dicha terapia.

2. El método del artículo 1, en el que la etapa (b) comprende un ELISA, un inmunoensayo, un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo inmunoradiométrico, un fluoroinmunoensayo, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo bioluminiscente, una electroforesis en gel, un análisis de transferencia de Western o un ensayo de hibridación *in situ*.

3. El método del artículo 1, en el que la etapa (a) comprende la amplificación de un transcrito de p53, hibridación *in situ*, transferencia de Northern o protección de nucleasa.

4. El método del artículo 1, en el que la etapa (a) comprende secuenciación, matrices génicas o microplacas génicas.

5. El método del artículo 1, en el que el tumor es un crecimiento tumoral benigno definido adicionalmente como hiperplasia prostática benigna, leucoplaquia oral, un pólipo colónico, un crecimiento precanceroso esofágico o una lesión benigna.

6. El método del artículo 1, en el que el tumor es un cáncer, definido adicionalmente como un cáncer oral, cáncer orofaríngeo, cáncer nasofaríngeo, cáncer respiratorio, cáncer urogenital, cáncer gastrointestinal, cáncer de tejido del sistema nervioso central o periférico, un cáncer endocrino o neuroendocrino o cáncer hematopoyético, glioma, sarcoma, carcinoma, linfoma, melanoma, fibroma, meningioma, cáncer del cerebro, cáncer orofaríngeo, cáncer nasofaríngeo, cáncer renal, cáncer biliar, feocromocitoma, cáncer de células de islotes pancreáticos,

5 tumores de Li-Fraumeni, cáncer tiroideo, cáncer paratiroideo, tumores de la hipófisis, tumores de la glándula adrenal, tumores de sarcoma osteogénico, tumores neuroendocrinos múltiples de tipo I y tipo II, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer traqueal, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer uterino, cáncer del cuello uterino, cáncer testicular, cáncer de colon, cáncer rectal o cáncer cutáneo.

10 7. El método del artículo 1, en el que la respuesta favorable a la terapia comprende reducción en el tamaño o carga tumoral, bloqueo del crecimiento tumoral, reducción en el dolor asociado a tumor, reducción en patología asociada a tumor, reducción en síntomas asociados a tumor, ausencia de progresión tumoral, intervalo sin enfermedad aumentado, tiempo hasta la progresión aumentado, inducción de remisión, reducción de metástasis o supervivencia del paciente aumentada.

15 8. Uso de un kit en el método *in vitro* para predecir una respuesta negativa o favorable a la terapia génica de p53 para un sujeto humano que tiene un tumor en el que dicho kit comprende:

- (a) un anticuerpo de p53 o una sonda para detectar una cantidad de proteína p53 en una muestra tumoral;
- (b) una pluralidad de sondas para determinar una estructura de gen o transcrito de p53.

20 Además, se desvela un método para predecir una respuesta favorable a una terapia génica de p53 para un sujeto humano que tiene un tumor: (a) determinar si las células tumorales de dicho tumor comprenden al menos un alelo de p53 de tipo silvestre; y/o (b) determinar si las células tumorales de dicho tumor expresan proteína p53 a un nivel que es mayor que el expresado en células no tumorales que expresan p53 normal.

25 Como se desvela en el presente documento, los presentes inventores han determinado que las células tumorales que (i) comprenden al menos un alelo de p53 de tipo silvestre y/o (ii) expresan un nivel de proteína p53 que no es mayor que el expresado en células no tumorales que expresan p53 normal, y/o (iii) expresan un nivel elevado de proteína p53, definido como un nivel que es mayor que el expresado en células no tumorales que expresan p53 normal, en el que dicha proteína p53 no inhibe la función de p53 de tipo silvestre, entonces uno cualquiera de (i) a (iii) sería predictivo de que dicho paciente tendrá una respuesta favorable a la terapia génica de p53. La terapia génica de p53 puede ser una terapia génica que comprenda usar un gen de p53 o un gen implicado en una ruta de p53, por ejemplo, Advexin™.

35 Como se desvela en el presente documento, si se descubre que las células tumorales (1) no contienen al menos un alelo de p53 de tipo silvestre y/o (2) contienen dos alelos de p53 mutantes y/o (3) expresan una proteína p53 mutante a niveles mayores que los expresados por células normales que expresan p53 normal y dicho p53 mutante inhibe la función de p53 de tipo silvestre, por ejemplo, mutantes que comprenden mutaciones puntuales de sentido erróneo en el dominio de unión a ADN con regiones de tetramerización intactas, entonces esto es indicativo de una respuesta insuficiente a la terapia génica de p53. Se conocen en la técnica otros tipos de mutaciones negativas dominantes y también pueden identificarse otras mediante ensayos funcionales (Resnick *et al.*, 2003). El alto nivel de expresión determinado por inmunohistología de dichas mutaciones negativas dominantes también es indicativo de una respuesta negativa a terapia.

45 Puede realizarse evaluación de niveles aumentados de p53 usando una diversidad de técnicas, incluyendo midiendo los niveles de proteína p53 mediante detección por anticuerpo de p53 en una célula tumoral (por ejemplo, detectable usando un inmunoensayo tal como inmunohistoquímica (IHC)). Como alternativa, los transcritos de p53 pueden amplificarse y medirse en una célula para evaluar la sobreexpresión de o niveles aumentados de p53 usando, por ejemplo, PCR cuantitativa o RT-PCR. Sin embargo, se anticipa que prácticamente cualquier ensayo para análisis de p53 puede calibrarse, por comparación con detección de p53 en un número suficiente de células no tumorales que expresan p53, para su uso con la presente invención, por ejemplo, ELISA, inmunoensayo, radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoradiométrico, fluoroinmunoensayo, ensayo quimioluminiscente, ensayo bioluminiscente, electroforesis en gel, análisis de transferencia de Western o ensayo de hibridación *in situ*.

55 La presencia de alelo de p53 de tipo silvestre y estructura de gen mutante pueden determinarse usando hibridación *in situ*, transferencia de Northern o protección de nucleasa o usando una diversidad de técnicas de genotipación basándose en hibridación con una pluralidad de sondas, por ejemplo, secuenciación, matrices génicas o microplacas génicas. Particularmente, se amplifican secuencias genómicas en células tumorales del tumor que pueden estar incluidas en parafina.

60 El tumor puede ser un crecimiento tumoral benigno (por ejemplo, hiperplasia prostática benigna, leucoplaquia oral, un pólipo de colon, un crecimiento precanceroso esofágico o una lesión benigna). El tumor puede ser cáncer, tal como cáncer oral, cáncer orofaríngeo, cáncer nasofaríngeo, cáncer respiratorio, un cáncer urogenital, un cáncer gastrointestinal, un cáncer de tejido del sistema nervioso central o periférico, un cáncer endocrino o neuroendocrino, un cáncer hematopoyético, un glioma, un sarcoma, un carcinoma, un linfoma, un melanoma, un fibroma, un meningioma, cáncer del cerebro, cáncer orofaríngeo, cáncer nasofaríngeo, cáncer renal, cáncer biliar, cáncer prostático, feocromocitoma, cáncer de células de islotes pancreáticos, un tumor de Li-Fraumeni, cáncer tiroideo, 65 cáncer paratiroideo, tumores de la hipófisis, tumores de las glándulas adrenales, tumores de sarcoma osteogénico,

5 tumores neuroendocrinos múltiples de tipo I y tipo II, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer traqueal, cáncer cutáneo, cáncer de cerebro, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer uterino, cáncer del cuello uterino, cáncer testicular, cáncer de colon, cáncer rectal o cáncer cutáneo. Por ejemplo, el tumor puede ser carcinoma de células escamosas (SCCHN), más específicamente, SCCHN recurrente.

10 La respuesta favorable a la terapia puede comprender reducción del tamaño o carga tumoral, bloqueo del crecimiento tumoral, reducción del dolor asociado a tumor, reducción de la patología asociada a tumor, reducción de los síntomas asociados a tumor, ausencia de progresión tumoral, intervalo sin enfermedad aumentado, tiempo hasta la progresión aumentado, inducción de remisión, reducción de metástasis o supervivencia del paciente aumentada. En particular, "respuesta tumoral" puede referirse a control del crecimiento tumoral (control del crecimiento tumoral (CCT) definido por reducciones completa (RC) y parcial (RP) del tamaño de > 50 % o enfermedad estable (EE); CCT = RC + RP + EE) o reducciones del tamaño tumoral de > 10 %.

15 También se desvela un método definido adicionalmente por comprender las etapas de (a) determinar si las células tumorales comprenden dos alelos de p53 de tipo silvestre; y, si fuera así, entonces (b) administrar una terapia génica de p53 al sujeto. También se desvela que el método puede definirse por comprender las etapas de (a) determinar si las células tumorales comprenden al menos un alelo de p53 de tipo silvestre y si las células tumorales no sobreexpresan la proteína p53; y, si lo hicieran, entonces (b) administrar al sujeto una terapia génica de p53.  
 20 También se desvela que el método podría definirse por comprender las etapas de (a) determinar si las células tumorales no contienen un alelo mutante de p53; y, si lo hicieran, entonces (b) administrar al sujeto una terapia génica de p53. También se desvela que el método puede definirse por comprender las etapas de (a) determinar si las células tumorales no sobreexpresan una proteína p53 mutante que inhibe la función de p53 de tipo silvestre; y, si lo hicieran, entonces (b) administrar al sujeto una terapia génica de p53.

25 También se desvela que el método puede definirse adicionalmente por comprender las etapas de (a) determinar si las células tumorales sobreexpresan una proteína p53 que no inhibe la función del p53 de tipo silvestre; y, si lo hicieran, entonces (b) administrar al sujeto una terapia génica de p53. También se desvela que el método puede definirse adicionalmente por comprender las etapas de (a) determinar si las células tumorales sobreexpresan una proteína p53 mutante y dicha p53 mutante inhibe la función de p53 de tipo silvestre; y, si lo hicieran, entonces (b) administrar al sujeto una terapia distinta de terapia de p53. También se desvela que el método puede definirse por comprender las etapas de (a) determinar si las células tumorales no contienen al menos un alelo de p53 de tipo silvestre; y, si lo hicieran, entonces (b) administrar al sujeto una terapia distinta de terapia de p53. También se desvela que el método puede definirse por comprender las etapas de (a) determinar si las células tumorales contienen dos alelos de p53 mutantes; y, si lo hicieran, entonces (b) administrar al sujeto una terapia distinta de terapia de p53. La otra terapia puede ser metotrexato.

30 También se desvela que el método puede comprender además una segunda terapia antitumoral. La segunda terapia antitumoral puede ser una terapia quirúrgica, quimioterapia, radioterapia, crioterapia, tratamiento por hipertermia, fototerapia, terapia por radioablación, terapia hormonal, inmunoterapia, terapia de moléculas pequeñas, terapia inhibidora de quinasa receptora y terapias biológicas tales como anticuerpos monoclonales, ARNip, oligonucleótidos antisentido, ribozimas o terapia génica.

35 La terapia biológica puede ser una terapia génica, tal como terapia génica supresora de tumores, una terapia génica de proteínas de muerte celular, una terapia génica reguladora del ciclo celular, una terapia génica de citocinas, una terapia génica de toxinas, una terapia inmunogénica, una terapia génica de suicidio, una terapia génica profarmacológica, una terapia génica antiproliferación celular, una terapia génica enzimática o una terapia génica antifactor angiogénico.

40 La terapia supresora de tumores puede ser APC, CYLD, HIN-1, KRAS2b, p16, p19, p21, p27, p27mt, p53, p57, p73, PTEN, FHIT, Rb, uteroglobina, Skp2, BRCA-1, BRCA-2, CHK2, CDKN2A, DCC, DPC4, MADR2/JV18, MEN1, MEN2, MTS1, NF1, NF2, VHL, WRN, WT1, CFTR, C-CAM, CTS-1, zacl, ras, MMAC1, FCC, MCC, FUS1, gen 26 (CACNA2D2), PL6, Beta\* (BLU), Luca-1 (HYAL1), Luca-2 (HYAL2), 123F2 (RASSF1), 101F6, o gen 21 (NPRL2). La terapia de proteínas proapoptóticas puede ser mda7, CD95, caspasa-3, Bax, Bag-1, CRADD, TSSC3, bax, hid, Bak, MKP-7, PARP, bad, bcl-2, MST1, bbc3, Sax, BDC o BID. La terapia reguladora del ciclo celular puede ser un oncogén antisentido, un ARNip de oncogén, un anticuerpo monocatenario de oncogén o una ribozima de oncogén. La terapia de citocinas puede ser GM-CSF, G-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32 IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  o PDGF. La terapia antiangiogénica puede ser angiostatina, endostatina, avastina o un antisentido, ARNip, anticuerpo monocatenario o una ribozima contra un factor proangiogénico.

45 La célula cancerosa puede tener una estructura proteica y/o de gen de p53 normal o una estructura proteica y/o de gen de p53 anómala. Por ejemplo, el gen de p53 puede producir una proteína p53 que es idéntica a una proteína p53 de tipo silvestre. En otras realizaciones, puede existir una mutación en la proteína p53 (por ejemplo, un truncamiento, una supresión, una sustitución, una mutación trans-dominante, etc.). El gen de p53 puede tener al

menos un alelo de p53 de tipo silvestre (es decir, el promotor, intrones, exones y la orientación apropiados están presentes) o el gen de p53 puede tener un alelo mutante (por ejemplo, un sentido erróneo, supresión, sustitución, reordenamiento, etc.).

5 También se desvela que la terapia génica puede suministrarse por un vector no viral. El vector no viral puede inmovilizarse en un vehículo lipídico (por ejemplo, un liposoma). El vehículo puede ser una nanopartícula. La terapia génica puede suministrarse por un vector viral (por ejemplo, un vector retroviral, un vector adenoviral, un vector viral adenoasociado, un vector viral de viruela, un vector viral de poliovirus, un vector lentiviral o un vector de herpesvirus).

10 La terapia génica puede ser una terapia génica local/regional. La terapia génica local/regional puede comprender una terapia génica localizada. La terapia génica localizada puede comprender inyección directa del tumor, inyección de la vasculatura tumoral, terapia génica regional o administración a un vaso o conducto linfático asociado a tumor. La administración puede comprender administración intraperitoneal, intrapleural, intravesicular o intratecal. La terapia génica regional puede comprender administración al sistema de vasculatura de una extremidad asociada con el tumor.

15 También se desvela un kit que comprende un anticuerpo de p53 o sondas para detectar una cantidad de proteína p53 en una muestra tumoral y una pluralidad de sondas para determinar una estructura de transcrito o gen de p53. El kit se usa para determinar si las células tumorales comprenden al menos un alelo de p53 de tipo silvestre y si las células tumorales del mismo tumor expresan proteína p53 a un nivel que es mayor que el expresado en células no tumorales que expresan p53 normal para predicción de la respuesta favorable a una terapia génica de p53.

20 “p53” como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína p53 de tipo silvestre o mutante (por ejemplo, trans-dominante, sentido erróneo, etc.).

25 Se contempla que cualquier método o composición descritos en el presente documento, puede implementarse con respecto a cualquier otro método o composición descritos en el presente documento.

30 El uso de la palabra “un” cuando se usa junto con la expresión “que comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar “uno,” pero también es coherente con el significado de “uno o más” o “al menos uno.” El término “aproximadamente” significa, en general, el valor indicado más o menos 5 %. El uso del término “o” en las reivindicaciones se usa para indicar “y/o” a no ser que se indique de forma explícita que hace referencia a alternativas solamente o que las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la divulgación apoye una definición que se refiera a solamente alternativas y “y/o”.

35 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

#### 40 Descripción detallada de los dibujos

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

45 **FIG. 1 – Mecanismos de actividad de Advexin®.**

**FIG. 2 – Espectro de respuestas antitumorales a terapia de Advexin®.**

50 **FIG. 3 – Respuesta de enfermedad estable/senescencia en tumor de Li-Fraumeni después de terapia de Advexin®.** Remisión completa por exploración de PET de tumor pélvico en un paciente con Li-Fraumeni después de terapia de Advexin® de tumor inyectado (flecha). Las exploraciones de TC conjuntas revelaron enfermedad estable sin reducción del tumor. Clínicamente, la respuesta tumoral se asoció con dolor pélvico reducido y menor edema de las extremidades (Senzer, 2007).

55 **FIG. 4 – Respuesta de apoptosis/reducción tumoral en un tumor de cabeza y cuello recurrente después de terapia de Advexin®.** Reducción del tamaño tumoral con remisión completa por exploración de TC en SCCHN recurrente después de terapia de Advexin® de tumor inyectado (flecha).

60 **FIG. 5 – Correlación de control del crecimiento tumoral con supervivencia aumentada después de monoterapia de Advexin® - población de ITT T301.**

**FIG. 6 - Correlación de control del crecimiento tumoral con supervivencia aumentada después de monoterapia de Advexin® - población de ITT T201.**

65 **FIG. 7 - Correlación de control del crecimiento tumoral con supervivencia aumentada después de**

monoterapia de Advexin® - población de ITT T301 + T201.

FIG. 8 - Correlación de  $\geq 10\%$  de reducción tumoral con supervivencia aumentada después de monoterapia de Advexin® - poblaciones de ITT T301 + T201.

FIG. 9 - Correlación de  $\geq 50\%$  de reducción tumoral con supervivencia aumentada después de monoterapia de Advexin® - poblaciones de ITT T301 + T201.

FIG. 10 – Mecanismos de inactivación de p53 y secuenciación de p53 correspondiente y perfiles de biomarcadores de inmunohistoquímica.

FIG. 11 – La inactivación de p53 de tipo silvestre por mdm-2/4 se invierte por tratamiento de Advexin®. En tumores con secuencias de p53 de tipo silvestre, p53 endógeno normal se inactiva por regulación positiva de los inhibidores de p53 mdm-2 y mdm-4. Un nivel aumentado de p53 normal proporcionado por Advexin® es capaz de invertir la inhibición de mdm-2/4.

FIG. 12 – La mayoría de mutaciones de p53 están en el dominio de unión a ADN.

FIG. 13 – Las mutaciones de dominio de unión a ADN inactivan p53 mediante formación de tetrámeros que no se unirán con ADN.

FIG. 14 – El bajo nivel de expresión de p53 mutada es un perfil de biomarcadores de p53 favorable para eficacia de Advexin®.

FIG. 15 – El alto nivel de expresión de p53 mutada es un perfil de biomarcadores de p53 negativo dominante desfavorable para eficacia de Advexin®.

FIG. 16 – Poblaciones de pacientes con supresión de tumores por p53 bloqueada.

FIG. 17 – Perfiles de p53 favorables y desfavorables para eficacia de Advexin® predicen el beneficio de supervivencia de Advexin® en cáncer de SCCHN recurrente (T301). Favorable – alto nivel de p53 de tipo silvestre; bajo nivel de p53 mutada; bajo nivel de p53 de tipo silvestre. Desfavorable – alto nivel de p53 mutada.

FIG. 18 – Perfiles de p53 favorables y desfavorables para eficacia de Advexin® predicen el beneficio de supervivencia de Advexin® en cáncer de SCCHN recurrente (T301 + T201). Favorable – alto nivel de p53 de tipo silvestre; bajo nivel de p53 mutada; bajo nivel de p53 de tipo silvestre. Desfavorable – alto nivel de p53 mutada.

FIG. 19 - Perfiles de p53 favorables y desfavorables para eficacia de Advexin® no predicen el resultado de metotrexato en cáncer de SCCHN recurrente. Favorable – alto nivel de p53 de tipo silvestre; bajo nivel de p53 mutada; bajo nivel de p53 de tipo silvestre. Desfavorable – alto nivel de p53 mutada.

FIG. 20 - Perfiles de p53 favorables y desfavorables para eficacia de Advexin® predicen el beneficio de supervivencia de Advexin® en cáncer de SCCHN recurrente (T301). Favorable – alto nivel de p53 de tipo silvestre; bajo nivel de p53 mutada; bajo nivel de p53 de tipo silvestre. Desfavorable – alto nivel de p53 mutada.

FIG. 21 – El metotrexato es eficaz en pacientes con perfiles de p53 desfavorables para eficacia de Advexin® en cáncer de SCCHN recurrente. Favorable – alto nivel de p53 de tipo silvestre; bajo nivel de p53 mutada; bajo nivel de p53 de tipo silvestre. Desfavorable – alto nivel de p53 mutada.

## Descripción de las realizaciones ilustrativas

### I. La presente invención

Como se analiza en el presente documento, la terapia génica en el nivel clínico se ha estudiado durante más de una década, incluyendo varios ensayos de terapia de cáncer. En general, el éxito de este enfoque ha sido prometedor con beneficios aumentados con respecto a los vistos con enfoques terapéuticos tradicionales. Sin embargo, como con la mayoría de tratamientos antineoplásicos, sigue existiendo una necesidad sustancial de mejora en la identificación de poblaciones de pacientes que puedan beneficiarse más de la eficacia de la terapia génica u otros tratamientos.

La evaluación previa de perfiles de biomarcadores de p53 es inadecuada para predecir completamente la respuesta de tratamiento o pronóstico debido a que no consiguen identificar todos los casos que tienen una proteína p53 normal funcional, que es la clave para las determinaciones predictivas y de pronóstico. Solicitudes previas enseñan algo distinto a la presente invención por considerar típicamente la detección de una proteína p53 anormalmente elevada o mutaciones génicas de p53, pero que no contienen una proteína p53 normal funcional como un marcador

predictivo o de pronóstico. Los inventores descubrieron inesperadamente la combinación correcta y aplicaciones de estado de mutación del gen y cantidad de expresión de p53 que se requieren para identificar la presencia de proteína p53 funcional normal para predecir respuestas terapéuticas a una terapia génica de p53. Este resultado inesperado indica por qué los intentos previos de utilizar la inmunohistología de p53 o análisis de secuenciación ha conducido a resultados conflictivos con respecto a la capacidad de estos perfiles de biomarcador de p53 para predecir rutinariamente las respuestas de tratamiento y el pronóstico.

Aquí, los inventores proporcionaron un método que usa combinaciones de perfiles de biomarcadores de p53 para predecir la respuesta o grado de beneficio a un paciente de una terapia de cáncer. En una realización particular, la terapia de cáncer es una terapia génica, por ejemplo, terapia génica de p53 adenoviral tal como terapia de Advexin®.

#### **A. Perfil de biomarcadores tumorales de p53 que predicen la respuesta a una terapia génica de p53**

Los inventores han descubierto que las siguientes combinaciones de biomarcadores tumorales típicamente predicen resultados de pronóstico y eficacia favorables: (1) alto nivel de proteína p53 normal (por ejemplo, inmunohistoquímica positiva con secuencia de p53 de tipo silvestre); (2) nivel bajo de proteína p53 (inmunohistología negativa) con detección de al menos un alelo normal con una secuencia génica de p53 anómala (puede observarse inmunohistología negativa cuando hay un alelo de p53 normal y un alelo anómalo como se describe en Trkova *et al.* (2003)); o (3) bajo nivel de proteína p53 normal (inmunohistología negativa con secuencia de p53 de tipo silvestre). Cada uno de estos perfiles de biomarcadores típicamente define una condición en la que es probable que un gen de p53 normal esté activo. A este respecto, una terapia génica de p53 que dará como resultado una expresión aumentada del gen de p53 normal contribuirá a la eficacia terapéutica y superará la inactivación de p53 mediada por inhibidores como MDM2, MDM4 o bajo nivel de expresión de proteína p53 mutada negativa dominante como se analiza posteriormente. La transducción de células con vector adenoviral deficiente en replicación solo podría inducir también expresión de p53 de tipo silvestre en células que contienen un gen de p53 de tipo silvestre (Mcpake *et al.*, 1999).

La estructura génica de p53 normal se define como una estructura génica de p53 que es idéntica a la de células normales no tumorales que expresan p53. Los alelos de p53 de tipo silvestre tienen la misma secuencia de ADN que los de células normales no tumorales de p53. El nivel elevado de proteína p53 o sobreexpresión de p53 se define como un nivel que es mayor que el expresado en células no tumorales que expresan p53 normales. El nivel normal de proteína p53 se define como un nivel que no es mayor que el expresado en células no tumorales con p53 normal.

##### **1. Nivel de p53 elevado y gen de p53 normal predicen respuesta favorable**

Un alto nivel de expresión de p53 acoplado con un genotipo de p53 normal (que consiste en alelos de p53 de tipo silvestre) indica la presencia de altos niveles de p53 normal. Se sabe que muchos de estos tumores tienen niveles elevados de MDM2 o MDM4 que inhibe la actividad de p53 (Valentin-Vega *et al.*, 2007). Sin embargo, Valentin-Vega *et al.* (2007) no enseña que esta circunstancia se correlacione con ningún beneficio de pronóstico favorable que solamente se enseñe en la presente invención. La presente invención indica que cuando estos tumores se exponen a agentes terapéuticos que inducen respuestas de tensión con regulación positiva adicional de expresión de p53 o que suministran p53 de tipo silvestre adicional como Advexin®, o que regulan negativamente inhibidores de p53 como nutlinas, la supresión se supera y las rutas de supresores de tumores se activan después dando como resultado eficacia terapéutica y respuestas terapéuticas, por ejemplo reducciones en el tamaño tumoral, etc.

##### **2. Bajo nivel de p53 y gen de p53 normal predicen una respuesta favorable**

Se producen circunstancias similares cuando la evaluación inmunohistológica de p53 revela un bajo nivel de expresión con secuencias génicas de p53 normales (que consisten en alelos de p53 de tipo silvestre). Estos tumores no tienen ningún defecto de p53 o pueden tener inhibidores de p53 regulados positivamente como MDM2 o MDM4 o posiblemente otros métodos para bloquear p53 (Valentin-Vega *et al.*, 2007). Sin embargo, Valentin-Vega *et al.* (2007) no enseñan que esta circunstancia se correlacione con ningún beneficio de pronóstico favorable que solamente se enseñe en la presente invención. En pacientes con perfiles de expresión de proteína p53 normal de bajo nivel, la administración de p53 de tipo silvestre y/o una terapia génica de p53 que dé como resultado la regulación positiva de p53 de respuestas de tensión o regule negativamente inhibidores de p53 como nutlinas, aumentará la expresión de p53 normal en relación con sus supresores y superará los inhibidores de p53 con efectos supresores de tumores terapéuticos resultantes.

##### **3. Bajo nivel de p53 y gen de p53 anómalo predicen una respuesta favorable**

Poeta (2007), Olivier (2006) y Soussi (2006) enseñan que la presencia de un gen de p53 mutado, que puede inhibir la acción de p53 normal, es una circunstancia que predice resultados clínicos negativos. Estos casos tienen en general mutaciones de p53 en el dominio de unión a ADN con dominios de tetramerización intactos que dan como resultado la capacidad del p53 mutado para unirse con e inactivar p53 normal. Dichas mutaciones se denominan mutaciones de p53 negativas dominantes o mutaciones inactivadoras o de bloqueo. Sin embargo, su presencia por

sí sola (como se detecta por métodos de secuenciación génica) no es suficiente para predecir correctamente el resultado como se describe en Poeta (2007), Olivier (2006) y Soussi (2006), porque no consideran el nivel de dicha proteína inhibidora que afecta a su capacidad para inactivar un segundo alelo de p53 normal cuando está presente. Además de la presencia de dichas mutaciones inactivadoras o negativas dominantes, el nivel de su expresión es importante para determinar su efecto en p53 normal. La presente invención desvela que la presencia de una mutación de p53 inactivadora no se correlacionó con una respuesta negativa al tratamiento de p53 si hubo un nivel bajo de expresión de proteína p53.

Trkova *et al.* (2003) han descrito que los pacientes con secuencias de p53 mutadas y bajos niveles de p53 por evaluaciones inmunohistológicas tienen con frecuencia un segundo gen de p53 normal. Sin embargo, Trkova *et al.* (2003) no enseñan que esta circunstancia se correlacione con ningún beneficio de pronóstico favorable que solamente se desvela por la presente invención.

#### 4. Alto nivel de p53 y gen de p53 anómalo

Como se ha descrito anteriormente, la presencia de un gen de p53 mutado por sí sola no es suficiente para predecir respuesta clínica negativa a terapia de cáncer. La presente invención desvela que las condiciones que permitirían o evitarían la función de p53 normal son el factor clave para aplicaciones predictivas y de pronóstico de perfiles de biomarcadores de p53 por combinación de los análisis de secuenciación génica y cantidad de p53. Si estas mutaciones de p53 se expresan a alto nivel y son mutaciones de bloqueo que pueden inhibir la función de p53 normal incluso si está presente un gen de p53 de tipo silvestre, por ejemplo, mutaciones negativas dominantes en el dominio de unión a ADN con dominios de tetramerización intactos que dan como resultado la capacidad del p53 mutado para unirse con e inactivar p53 normal, es más probable que estos casos se asocien con respuesta negativa a una terapia génica de p53 porque la función de p53 normal introducida o inducida por la terapia se bloquea por un alto nivel de mutantes de p53 perjudiciales. Estos tipos de mutaciones comprenden aproximadamente 80 % de mutaciones de p53 (mutaciones de sentido erróneo en el dominio de unión a ADN con capacidad de tetramerización intacta) y se asociarán con una respuesta insuficiente al tratamiento cuando la proteína p53 codificada por dichos genes de p53 mutados se expresen a altos niveles en la célula tumoral.

Sin embargo, en las células tumorales que expresan p53 alto y p53 mutado, si estas mutaciones son mutaciones que no inhiben la función de p53 de tipo silvestre, por ejemplo mutaciones con dominios de tetramerización truncados con los que p53 mutado resultante no puede unirse e inactivar p53 normal, estas células tumorales pueden responder favorablemente a una terapia génica de p53.

En general, en comparación con el análisis de perfil de biomarcadores de p53 anterior, todos los métodos previos de evaluaciones de biomarcadores de p53 (Kyzas *et al.*, 2005; George *et al.*, 2007; Olivier *et al.*, 2006; Geisler *et al.*, 2002; Poeta *et al.*, 2007; Soussi *et al.*, 2006) enseñan solamente reconocimiento parcial de los elementos críticos que se requieren para predecir uniforme y específicamente los resultados terapéuticos. Todos los métodos que se basan solamente en inmunohistoquímica (Geisler *et al.*, 2002) o solamente en análisis de secuenciación génica (Poeta *et al.*, 2007, Soussi *et al.*, 2006, Olivier *et al.*, 2006) pasan por alto información importante con respecto a la presencia o nivel de proteína p53 normal o anómala que es crítica para las decisiones de pronóstico/predictivas correctas. Los estudios que combinan evaluaciones de inmunohistología y secuenciación génica de p53 (Kyzas *et al.*, 2005; George *et al.*, 2007) han combinado la información inadecuadamente, de forma incompleta o de forma incorrecta lo que conduce a conclusiones erróneas con respecto a la capacidad predictiva de estas evaluaciones.

Por ejemplo, George *et al.* (2007) no enseñan la importancia de la presencia de un gen/proteína p53 funcional en su aplicación de análisis de inmunohistología de p53 y secuenciación de p53. Incluyen pacientes con nivel de expresión tanto alto como bajo de mutaciones del exón 5 de la proteína p53 en la mejor categoría de pronóstico. Ignoran la importancia del nivel de expresión de la proteína p53 con el exón 5 mutado y mantienen que los pacientes con mutaciones del exón 5 de p53 se comportan como los que tienen configuraciones génicas de p53 normales. El mal pronóstico de pacientes con alto nivel de expresión de proteína p53 con exón 5 mutado no se anticipa o predice por la enseñanza de George *et al.* (2007) que consideran que todos los casos con el exón 5 mutado tienen un buen pronóstico independientemente de su nivel de expresión de p53. En ensayos clínicos de p53, ninguno de estos pacientes que expresan proteína p53 mutada en el exón 5 de alto nivel tuvieron una respuesta al tratamiento y la mediana de su supervivencia fue similar a la de otros pacientes con mutaciones de p53 negativas trans-dominantes en otros exones de dominio de unión a ADN. La mayoría de los casos en el estudio de George *et al.* (2007) con mutaciones en el exón 5 tuvieron bajo nivel de expresión de proteína p53 que denominaron incorrectamente de tipo silvestre cuando reflejó bajos niveles de proteína p53 mutada anómala. En su estudio, estos casos se combinaron para clasificación con un menor número de casos de proteína p53 con exón 5 mutado de alta expresión que no alteraban significativamente la mediana de supervivencia de un grupo de pronóstico favorable que definieron combinando todos estos casos con un número aún mayor de pacientes que tenían niveles normales de proteína p53 normal. Por lo tanto, George *et al.* (2007) no enseñan la importancia de reconocer perfiles en los que p53 normal no será funcional, no enseñando la importancia de un alto nivel de proteína p53 negativa trans-dominante inactivadora de p53 de mutaciones del exón 5 que pueden inactivar p53 normal si están presentes.

Estas conclusiones no podrían haberse conocido o deducido combinando los resultados de la bibliografía existente como se demuestra por la incapacidad de los estudios precedentes para utilizar o definir las combinaciones correctas. La presente invención ha revelado las combinaciones de secuenciación génica y expresión de proteínas correcta y apropiada para identificar perfiles de p53 favorables y desfavorables basándose en condiciones que permitirían o evitarían la función de p53 normal como se describe en el presente documento como el factor clave para aplicaciones predictivas y de pronóstico de perfiles de biomarcadores de p53.

**B. Evaluación de perfil de biomarcadores de p53 por análisis de combinación de estructura génica y nivel de expresión de p53**

**1. Determinación de la estructura génica de p53**

p53, uno de los supresores de tumores mejor conocidos, es una fosfoproteína de aproximadamente 390 aminoácidos, que puede subdividirse en cinco dominios: un dominio de transcripción-activación N terminal (TAD), que activa factores de transcripción; un dominio rico en prolina importante para la actividad apoptótica de p53; un dominio de núcleo de unión a ADN central (DBD), que contiene un átomo de cinc y varios aminoácidos arginina (codificados por los exones 5-8); un dominio de homooligomerización (tetramerización) (DO) - tetramerización es esencial para la actividad de p53 *in vivo*; un extremo C terminal implicado en la regulación negativa de la unión a ADN del dominio central.

p53 se localiza en el núcleo de las células y es muy lábil. Los agentes que dañan el ADN inducen que p53 se convierta en muy estable por un mecanismo postraduccional, permitiendo que su concentración en el núcleo aumente drásticamente. p53 suprime la progresión por el ciclo celular en respuesta a daño de ADN, permitiendo de este modo que se produzca reparación de ADN antes de replicar el genoma. Por lo tanto, p53 evita la transmisión de información genética dañada de una generación celular a la siguiente iniciando la apoptosis si el daño a la célula es grave.

Como se ha analizado anteriormente, las mutaciones en p53 pueden provocar que las células se transformen oncogénicamente, y los estudios de transfección han mostrado que p53 actúa como un supresor de tumores, capaz de restaurar algo del nivel de crecimiento normal a células cancerosas *in vitro*. p53 es un factor de transcripción y una vez activado, reprime la transcripción de varios genes que están implicados en la estimulación del crecimiento celular, estimulando al mismo tiempo la expresión de otros genes implicados en el control del ciclo celular.

Las mutaciones que desactivan p53 en cáncer se producen habitualmente en el dominio de unión a ADN. La mayoría de estas mutaciones de unión a ADN dejan intacto el dominio de tetramerización que puede tetramerizar con moléculas de p53 de tipo silvestre e inhibir la capacidad del tetrámero heterogéneo para unirse con sus secuencias de ADN diana, bloqueando de este modo la función de p53 normal en la activación transcripcional de genes corriente abajo. Por lo tanto p53 con mutaciones del dominio de unión a ADN que puede oligomerizar con p53 normal tienen un efecto negativo dominante en la función de p53. Las mutaciones con efectos negativos dominantes también pueden confirmarse usando ensayos funcionales como se describe posteriormente.

En ciertos aspectos, las células que tienen niveles elevados de p53 serán por lo tanto las células que tengan mutaciones de sentido erróneo de p53, mutaciones trans-dominantes y mutaciones de ganancia de función (por ejemplo, de Vries *et al.*, 2002) que conducen a la sobreexpresión o degradación reducida de p53. Los inventores contemplan que, particularmente en pacientes con un alto nivel de expresión de proteína p53 mutada que inhibe la función de p53 de tipo silvestre, tal como p53 con mutación de sentido erróneo o mutaciones trans-dominantes en los exones 5-8 del dominio de núcleo de unión a ADN con dominios de tetramerización intactos, será menos probable que una célula que sobreexpresa p53 dada, cuando se transduce con p53 adenoviral, produzca suficiente p53 de tipo silvestre para erradicar los efectos de un alelo trans-dominante o de ganancia de función de p53 endógeno que se sobreexpresa, por tanto será más probable que los pacientes tengan respuestas desfavorables a una terapia génica de p53. La predicción similar de respuesta desfavorable se aplica a células tumorales que no contienen un alelo de p53 de tipo silvestre o contienen dos alelos de p53 mutantes. Para un paciente que se ha predicho que tiene una respuesta desfavorable a una terapia génica de p53, la presente invención puede proporcionar un método que comprende administrar al paciente una terapia distinta de una terapia de p53, tal como metotrexato.

En algunos otros aspectos, las células que tienen un alelo de p53 de tipo silvestre y/o células que no tienen un alto nivel de p53 mutado inhibidor o de bloqueo probablemente respondan a una terapia génica de p53 favorablemente como se predice por el perfil de biomarcadores de p53. La terapia génica de p53 para introducir p53 de tipo silvestre exógeno combinado con el efecto de vector adenoviral en la inducción de p53 de tipo silvestre endógeno aumentará la producción de p53 de tipo silvestre en la célula y superarán los defectos en esos casos.

Para detectar la estructura génica de p53 en un tejido tumoral, es útil aislar y evaluar la muestra tumoral para detectar la presencia de células normales que pueden estar presentes en estos tejidos. Se conocen en la técnica medios para enriquecer una preparación tisular para células tumorales. Por ejemplo, el tejido puede aislarse a partir de secciones incluidas en parafina o en criostato que se han teñido y evaluarse microscópicamente para determinar

una preponderancia de células tumorales. Las células cancerosas también pueden separarse de células normales por citometría de flujo. Estas así como otras técnicas para separar células tumorales de normales se conocen bien este campo.

5 Si el tejido tumoral está altamente contaminado con células normales, aún se consigue fácilmente detección de mutaciones por técnicas de secuenciación y matrices de microplacas que emplean amplificación por PCR de secuencias de ácido nucleico de muestra. La presencia de células normales en la muestra puede hacer más difícil de distinguir la detección de alelos de p53 normales en las células tumorales. El desarrollo reciente de sistemas de microdissección basados en tecnología láser ha resuelto en gran medida este importante problema. La  
10 microdissección con láser es una herramienta potente para el aislamiento de poblaciones celulares específicas (o células individuales) de secciones teñidas de tejidos tanto fijados en formalina, incluidos en parafina como congelados, de cultivos celulares e incluso de un único cromosoma dentro de una célula en metafase. El material resultante es adecuado para una amplia serie de ensayos corriente abajo tales como estudios de LOH (pérdida de heterocigosidad), análisis de expresión génica en el nivel de ARNm y una diversidad de enfoques proteómicos tales como análisis en gel bidimensional, matriz de proteínas de fase inversa y perfil proteico SELDI. La aplicación de PCR de células individuales también se contempla para evitar contaminación tisular normal.

La hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) y matrices de polimorfismo de nucleótidos individuales son métodos adicionales que pueden detectar la presencia de alelos de p53 normales en células tumorales incluso en muestras que contienen una mezcla de células tumorales y normales (Yamamoto *et al.*, 2007; Ross, *et al.*, 2007, George *et al.*, 2007; Flotho *et al.*, 2007; Fitzgibbon *et al.*, 2007; Melcher *et al.*, 2007; Purdie *et al.*, 2007; Kawamata *et al.*, 2008; Lindbjerg *et al.*, 2007; van Beers *et al.*, 2006).

La detección de mutaciones puntuales puede conseguirse por clonación molecular del alelo (o los alelos) de p53 presente en el tejido tumoral y secuenciando ese alelo o esos alelos usando técnicas bien conocidas en este campo. Como alternativa, la reacción en cadena de la polimerasa puede usarse para amplificar secuencias génicas de p53 de una preparación de ADN genómico del tejido tumoral. Después puede determinarse la secuencia de ADN de las secuencias amplificadas. La reacción en cadena de la polimerasa en sí misma se conoce bien en la técnica. Véase por ejemplo, Saiki *et al.* (1988); patentes de Estados Unidos n.º 4.683.202; y 4.683.195.

También pueden detectarse supresiones o truncamiento específicos de genes de p53. Por ejemplo, pueden usarse sondas de polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (RFLP) para el gen de p53 o genes marcadores circundantes para puntuar la pérdida o pérdida parcial de un alelo de p53. Pueden usarse otras técnicas para detectar supresiones o truncamiento, como se conoce en este campo.

Como alternativa, puede usarse detección de desapareamiento para detectar mutaciones puntuales en el gen de p53 o su producto de ARNm. Aunque estas técnicas son menos sensibles que la secuenciación, son más sencillas de realizar en un gran número de tumores. Un ejemplo de una técnica de escisión de desapareamiento es el método de protección de RNasa, que se describe en detalle en Winter *et al.* (1985); Meyers *et al.* (1985).

De una manera similar, pueden usarse sondas de ADN para detectar desapareamientos, mediante escisión enzimática o química. Véase, por ejemplo, Cotton *et al.* (1988); Shenk *et al.* (1975). Como alternativa, pueden detectarse desapareamientos por desplazamientos en la movilidad electroforética de dobles cadenas desapareadas en relación con dobles cadenas coincidentes. Véase, por ejemplo, Cariello (1988). Con ribosondas o sondas de ADN, el ARNm o ADN celular que podría contener una mutación puede amplificarse usando PCR antes de la hibridación.

Las secuencias de ADN del gen de p53 del tejido tumoral que se han amplificado por uso de reacción en cadena de la polimerasa también pueden explorarse usando sondas específicas de alelos. Estas sondas son oligómeros de ácidos nucleicos, cada uno de los cuales contiene una región de la secuencia del gen de p53 que alberga una mutación conocida. Por ejemplo, un oligómero puede ser de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, correspondiente a una parte de la secuencia génica de p53. En la posición que codifica el codón 175 del gen de p53 el oligómero codifica una alanina, en lugar del codón de tipo silvestre valina. Mediante el uso de una batería de dichas sondas específicas de alelos, los productos de amplificación de PCR pueden explorarse para identificar la presencia de una mutación previamente identificada en el gen de p53. Puede realizarse hibridación de sondas específicas de alelos con secuencias de p53 amplificadas, por ejemplo, en un filtro de nailon. La hibridación con una sonda particular indica la presencia de la misma mutación en el tejido tumoral que en la sonda específica de alelo.

La identificación de cambios estructurales del gen de p53 en células tumorales se ha facilitado mediante el desarrollo y la aplicación de una serie diversa de plataformas de micromatrices de alta resolución, alto rendimiento. Esencialmente hay dos tipos de matrices; las que portan productos de PCR de ácidos nucleicos clonados (por ejemplo, ADNc, BAC, cósmidos) y las que usan oligonucleótidos. Cada una tiene ventajas y desventajas pero ahora es posible inspeccionar anomalías del número de copias de ADN en todo el genoma y niveles de expresión para permitir correlaciones entre pérdidas, ganancias y amplificaciones en células tumorales con genes que están sobre e infraexpresados en las mismas muestras. Las matrices de expresión génica que proporcionan estimaciones de los niveles de ARNm en tumores han dado lugar a matrices específicas de exones que pueden identificar niveles de

expresión génica, acontecimientos de corte y empalme alternativo y alteraciones de procesamiento de ARNm. También se usan matrices de oligonucleótidos para buscar polimorfismos de un único nucleótido (SNP) por todo el genoma para estudios de enlace y asociación y estos se han adaptado para cuantificar las anomalías del número de copias y acontecimientos de pérdida de heterocigosidad. En última instancia las matrices de secuenciación de ADN permitirán resecuenciar regiones cromosómicas y genomas completos.

En la presente invención, se contemplan matrices basadas en SNP u otras matrices génicas o microplacas para determinar la presencia de alelo de p53 de tipo silvestre y la estructura de mutaciones. Un polimorfismo de un único nucleótido (SNP), una variación en un único sitio en ADN, es el tipo más frecuente de variación en el genoma. Por ejemplo, hay una estimación de 5-10 millones de SNP en el genoma humano. Como los SNP están altamente conservados a lo largo de la evolución y dentro de una población, el mapa de SNP actúa como un marcador genotípico excelente para investigación. Una matriz de SNP es una herramienta útil para estudiar el genoma completo.

Además, puede usarse matriz de SNP para estudiar la pérdida de heterocigosidad (LOH). LOH es una forma de desequilibrio alélico que puede resultar de la pérdida completa de un alelo o de un aumento del número de copias de un alelo en relación con el otro. Aunque otros métodos basados en microplacas (por ejemplo, hibridación genómica comparativa) pueden detectar solamente ganancias o supresiones genómicas, la matriz de SNP tiene la ventaja adicional de detectar LOH neutra para el número de copias debido a disomía uniparental (UPD). En UPD, un alelo o cromosoma completo de un parental está ausente lo que conduce a reduplicación del otro alelo parental (uniparental = de un único padre, disomía= duplicado). En una situación de enfermedad esta aparición puede ser patológica cuando el alelo de tipo silvestre (por ejemplo, de la madre) está ausente y en su lugar están presentes dos copias del alelo heterocigoto (por ejemplo, del padre). Este uso de matriz de SNP tiene un enorme potencial en el diagnóstico de cáncer ya que LOH es una característica prominente de la mayoría de cánceres humanos. Estudios recientes basados en la tecnología de matrices de SNP han mostrado que no solamente los tumores sólidos (por ejemplo, cáncer gástrico, cáncer de hígado, etc.) sino también tumores malignos hematológicos (ALL, MDS, CML, etc.) tienen una alta tasa de LOH debido a las supresiones genómicas o UPD y ganancias genómicas. En la presente invención, el uso de matriz de SNP de alta densidad para detectar LOH permite la identificación de un patrón de desequilibrio alélico para determinar la presencia de alelo de p53 de tipo silvestre (Lips *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2007).

Los ejemplos de matrices de secuencias génicas de p53 y polimorfismos de nucleótidos individuales actuales incluyen matriz génica de p53 Gene Chip (Affymetrix, Santa Clara, CA), Ampli-Chip p53 Roche (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA), matrices de mapeo GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA), matriz de SNP 6.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA), BeadArrays (Illumina, San Diego, CA), etc.

También pueden detectarse mutaciones de genes de p53 de tipo silvestre basándose en la mutación de un producto de expresión de tipo silvestre del gen de p53. Dichos productos de expresión incluyen tanto el ARNm como el producto de proteína p53 en sí mismo. Pueden detectarse mutaciones puntuales secuenciando el ARNm directamente o mediante clonación molecular de ADNc preparada a partir del ARNm. La secuencia del ADNc clonado puede determinarse usando técnicas de secuenciación de ADN que se conocen bien en este campo. El ADNc también puede secuenciarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Podría usarse un panel de anticuerpos monoclonales en los que cada uno de los epítomos implicados en las funciones de p53 se representa por un anticuerpo monoclonal. La pérdida o perturbación de la unión de un anticuerpo monoclonal en el panel indicaría alteración de mutación de la proteína p53 y por lo tanto del gen de p53 en sí mismo. También pueden detectarse genes o productos génicos de p53 mutantes en muestras corporales, tales como suero, heces u otros fluidos corporales, tales como orina y esputo. Las mismas técnicas analizadas anteriormente para detección de genes o productos génicos de p53 mutantes en tejidos pueden aplicarse a otras muestras corporales.

## 2. Evaluación del nivel de proteína p53

Pueden usarse diversos parámetros de pacientes, incluyendo historial/características de paciente/enfermedad así como características moleculares (por ejemplo, sobreexpresión de p53 en un tumor canceroso combinado con análisis de estructura génica), como factores de pronóstico para predecir la respuesta o el grado de beneficio a un paciente de una terapia de cáncer (por ejemplo, terapia génica de p53 adenoviral) como se enseña en la presente invención.

Las evaluaciones de niveles aumentados de proteína p53 pueden ser directas, como en el uso de inmunohistoquímica cuantitativa (IHC) u otros ensayos basados en anticuerpos (transferencia de Western, FIA, un radioinmunoensayo (RIA), RIP, ELISA, inmunoensayo, ensayo inmunoradiométrico, un fluoroinmunoensayo, un inmunoensayo, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo bioluminiscente, una electroforesis en gel), o indirectamente cuantificando los transcritos de estos genes (hibridación *in situ*, protección de nucleasa, transferencia de Northern o PCR, incluyendo RT-PCR).

Con respecto a la inmunohistología, las células normales expresan p53 a niveles bajos que proporcionan ausencia de tinción solamente leve en un pequeño porcentaje de células cuando se ven por microscopía óptica. La detección de tinción nuclear visible en proporciones mayores de las células tumorales es indicativa del estado de niveles elevados, sobreexpresados o altos de proteína p53.

Aunque sin desear quedar ligado a ninguna teoría específica, los inventores proponen que cuando una célula tumoral muestra niveles elevados de proteína p53 comparables con los de células somáticas normales, tales como un nivel elevado, esto es indicativo de una disfunción en la ruta supresora de tumor de p53, la principal ruta que regula la respuesta apoptótica de las células a la mutación genética. Los inventores postulan que cuando hay un defecto en alguna coyuntura de la ruta, dicho defecto se revela en los niveles de p53 elevados. Por ejemplo, se sabe que cuando hay un defecto en la proteína p53 en sí misma (es decir, que da como resultado una p53 "mutante"), específicamente en el dominio de unión a ADN, y dicho defecto da como resultado una proteína p53 disfuncional, que puede tetramerizar con proteína p53 normal pero no puede unirse con ADN, la función de p53 normal está bloqueada. La célula sobreexpresa la proteína disfuncional en relación con lo visto en células normales en un intento vano de conseguir un nivel "normal" de función de proteína p53. Además, las células tumorales con altos niveles de p53 mutada que pueden bloquear la función de p53 normal también tendrían una ventaja selectiva en comparación con células capaces de expresar niveles funcionales de p53 normal que suprimirían el crecimiento tumoral. Además, en algunos casos, la proteína p53 mutada puede ser menos susceptible de degradación o eliminación de la célula que p53 de tipo silvestre, lo que contribuye al contenido de p53 aumentado aparente de la célula.

Se sabe que niveles elevados de p53 representan anomalías de la ruta supresora de tumores de p53 y están asociados con un mal pronóstico en cánceres de SCCHN (Geisler *et al.*, 2002); sin embargo, la presente invención desvela que los niveles de proteína p53 aumentados solamente no es suficiente para predecir respuesta a terapia de cáncer. En una realización particular, la detección inmunohistoquímica de niveles elevados de p53 en comparación con tejidos no tumorales que expresan p53 normal, lo que se debe a alto nivel de proteínas mutantes que pueden bloquear la función de p53 de tipo silvestre normal, proporciona una predicción integrada de una respuesta desfavorable más probable a una terapia génica de p53. De hecho, se contempla que dicha correlación resultará evidente también en el caso de terapia génica u otros medicamentos que con frecuencia inducen respuestas de tensión mediadas por p53.

Los presentes inventores también proponen que podría ser más probable que un subconjunto de tumores con proteína p53 elevada respondiera favorablemente. Cuando se producen defectos en otra parte de la ruta (por ejemplo, en genes o elementos genéticos corriente arriba o corriente abajo de la proteína p53 en la ruta), dicho defecto o dichos defectos también pueden dar como resultado una alteración de la ruta, y por lo tanto conducir a elevación de la proteína p53, de nuevo supuestamente debido al intento de la célula para compensar la pérdida o reducción de la actividad de la ruta p53 apropiada. De hecho, aunque prácticamente todas las células somáticas normales expresan proteína p53 a niveles casi indetectables (por ejemplo, detectables solamente por técnicas extremadamente sensibles, tales como RT-PCR), se ha descubierto que un subconjunto definible de tumores tiene proteína p53 elevada, incluso aunque esté presente el alelo de p53 de tipo silvestre o estructura génica de p53 normal. En este caso, la función de p53 se suprime con frecuencia por expresión elevada de inhibidores de p53 como las moléculas MDM2 y MDM4. En dichas células tumorales con proteína p53 normal elevada, los tratamientos que estimulan respuestas de tensión de p53 pueden alterar favorablemente la relación de p53 normal con respecto a niveles inhibidores de p53 dando como resultado la restauración de la actividad de p53 normal y una respuesta favorable a terapia. En tumores sin ninguna p53 normal o en los que la p53 mutada ha bloqueado los efectos transdominantes como se describe en la presente invención, la función de p53 normal no se verá afectada y será menos probable que estos tumores respondan favorablemente a una terapia génica de p53 que ejerce sus efectos mediante activación de rutas dependientes de p53 (apoptosis, senescencia o detención del ciclo celular dependientes de p53).

Otro caso de respuestas favorables se ejemplifica por células tumorales con proteína p53 elevada con un dominio de tetramerización truncado. Esas proteínas mutantes no pueden tetramerizar con proteína p53 de tipo silvestre para interferir con su unión a ADN de modo que estas mutaciones no inhiban la función de proteína p53 de tipo silvestre. Estos tumores tendrían respuestas favorables al tratamiento con p53 cuando un segundo alelo de p53 normal esté presente o cuando se suministre p53 normal administrado de forma exógena al tumor.

El modo más común y conveniente de detectar dichos "niveles elevados" de un supresor de tumores tal como p53 es seleccionar una técnica que sea suficientemente sensible para reflejar o detectar los niveles de proteínas vistos habitualmente en células cancerosas, pero no suficientemente sensibles para detectar los niveles comunes a células somáticas normales. Las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") incluyen una familia de tecnologías de detección ejemplares aplicables que pueden emplearse para detectar el "nivel elevado" de p53, y por lo tanto son particularmente aplicables para la presente invención (véase, por ejemplo, Ladner *et al.*, 2000). Convenientemente, las técnicas de IHC no son generalmente suficientemente sensibles para detectar las cantidades pequeñas de proteína p53 producida, por ejemplo, en células somáticas normales, y por esta razón se emplean ahora típicamente para detectar niveles elevados de proteína p53. Una ventaja específica para la práctica en relación con la presente invención es que la detección por IHC de proteína p53 no diferenciará en general entre proteína p53 de tipo silvestre y mutante o aberrante (ya que el anticuerpo subyacente podrá seleccionarse, particularmente en el caso de la presente invención, para detectar la mayoría de proteínas p53 bien mutantes o bien normales. En estos casos, la

detección simultánea de secuencias génicas de p53 y el número de copias se combinan para determinar si el paciente tiene un perfil de p53 favorable o desfavorable para una respuesta a una terapia génica de p53.

No obstante, la presente invención no está por supuesto limitada de ningún modo al uso de técnicas de IHC para identificar y seleccionar pacientes que tengan tumores con niveles elevados de proteína p53, u otros defectos medibles en la ruta de p53, porque la invención contempla el uso de cualquier técnica que diferencie entre células que muestren expresión normal y anómala de p53. Los ejemplos incluirían técnicas de detección que se han calibrado apropiadamente para distinguir entre los niveles normales y anómalos de expresión de ARNm de p53 y/o niveles de traducción de proteína p53. Dichos métodos incluirán, además de detección inmunológica de proteínas p53, técnicas de hibridación de ácido nucleico tales como matrices y microplacas génicas, que se usan para detectar diferencias en los niveles de ARNm, y por lo tanto pueden emplearse para diferenciar los niveles de ARNm de p53. Las células normales y tumorales ejemplares (en forma de líneas celulares) que se sabe que tienen típicamente niveles normales y elevados de proteína p53 incluyen células tales como WI-38, CCD 16 y MRC-9, y líneas celulares tales como SCC61, SCC173 y SCC179, que pueden obtenerse de proveedores comunes tales como la ATCC y otros.

La presente invención, como se ha expuesto anteriormente, desvela que la terapia de p53, y en particular terapia de p53 adenoviral, puede actuar favorablemente en el subgrupo de pacientes con cáncer con niveles de p53 de tipo silvestre elevados y una ausencia de expresión de alto nivel de mutaciones de p53 con actividad de bloqueo. Por lo contrario, las células tumorales con proteína p53 elevada que bloquean proteína p53 de tipo silvestre responden insuficientemente a una terapia génica de p53. Esta clasificación que combina consideraciones de nivel de proteínas, secuencia génica y número de copias génicas proporciona una predicción precisa de respuestas terapéuticas en presencia de proteína elevada en lugar de un pronóstico incompleto solamente dependiente del nivel de proteína elevado o análisis de mutación por sí solos.

### 3. Caracterización de la función de p53 mutante

Pueden detectarse mutaciones que pueden inhibir la función de genes de p53 de tipo silvestre explorando con respecto a la pérdida de función de proteína p53 de tipo silvestre. Aunque aún tienen que dilucidarse todas las funciones que indudablemente posee la proteína p53, al menos se conocen las funciones de unión a ADN. Por ejemplo, la proteína p53 se une con el antígeno T grande de SV40 así como con el antígeno E1B de adenovirus u otra secuencia de ADN diana conocida. Para un experto en la materia, pueden usarse métodos convencionales para detectar la pérdida de la capacidad de la proteína p53 para unirse con uno o ambos de sus antígenos u otro ADN diana incluso en presencia de proteína p53 de tipo silvestre, lo que indica una alteración de mutación en la proteína que refleja una alteración por mutación del gen en sí mismo que podría bloquear la función de p53 de tipo silvestre probablemente mediante tetramerización con p53 de tipo silvestre y evitar la unión con ADN diana.

En la última década, se han realizado ensayos funcionales experimentales en células de levadura y humanas como conocen los expertos en la materia para medir diversas propiedades de proteínas p53 mutantes incluyendo: actividades de transactivación de proteínas mutantes en genes indicadores colocados bajo el control de elementos de respuesta a p53; efectos negativos dominantes sobre la proteína de tipo silvestre; inducción de detección del ciclo celular o apoptosis; sensibilidad a temperatura; actividades de proteínas mutantes que son independientes y no relacionadas con la proteína de tipo silvestre. Recientemente, los resultados de estos ensayos funcionales se han integrado en la base de datos de la agencia internacional para la investigación sobre el cáncer (IARC) TP53 a través de la web en [p53.iarc.fr/](http://p53.iarc.fr/). Esta base de datos proporciona datos estructurados y herramientas de análisis para estudiar los patrones de mutación de p53 (Peitjean *et al.*, 2007; Resnick e Inga, 2003). Estos métodos pueden emplearse para identificar las mutaciones de p53 que tengan la capacidad de ejercer efectos de bloqueo negativos dominantes que inhibirían la función de p53 normal. Cuando dichas mutaciones de p53 negativas trans-dominantes se expresan a altos niveles o cuando no hay ninguna capacidad para que una célula exprese p53 normal, por ejemplo, ningún alelo de p53 normal, dichos casos tienen un resultado desfavorable a una terapia génica de p53.

## II. Terapias de cáncer

También se desvelan métodos para predecir una respuesta favorable a un tratamiento de cáncer terapéutico y administrar una terapia basada en el perfil de biomarcadores de p53 como se ha descrito anteriormente. Más particularmente, también se desvela el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas administrando una terapia antitumoral tal como una terapia génica de p53.

### A. Enfermedad hiperproliferativa

Una enfermedad hiperproliferativa es una enfermedad asociada con el crecimiento o la multiplicación anómalos de células. La enfermedad hiperproliferativa puede ser una enfermedad que se manifiesta como lesiones en un sujeto, tal como un tumor. El tumor puede ser un crecimiento tumoral benigno o cáncer.

Los tumores ejemplares cuyo tratamiento se contempla en la presente invención incluyen los siguientes: carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenoma, adenocarcinoma, linitis plástica, insulinoma,

glucagonoma, gastrinoma, vipoma, colangiocarcinoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma quístico adenoide, tumor carcinoide, prolactinoma, oncocitoma, adenoma de células de hurthle, carcinoma de células renales, adenoma endometroide, cistadenoma, pseudomixoma peritoneal, tumor de Wartin, timoma, tecomoma, tumor de células de la granulosa, arrenoblastoma, tumor de células de Sertoli-Leidig, paraganglioma, feocromocitoma, tumor de glomus, melanoma, sarcoma de tejido blando, tumor de células redondas pequeñas desmoplásicas, fibroma, fibrosarcoma, mixoma, lipoma, liposarcoma, leiomioma, leiomiosarcoma, mioma, miosarcoma, rabdomioma, rabdomyosarcoma, adenoma pleomórfico, nefroblastoma, tumor de brenner, sarcoma sinovial, mesotelioma, disgerminoma, tumores de células germinales, carcinoma embrionario, tumor del saco vitelino, teratomas, quistes dermoides, coriocarcinoma, mesonefomas, hemangioma, angioma, hemangiosarcoma, angiosarcoma, hemangioendotelioma, hemangioendotelioma, sarcoma de Kaposi, hemangiopericitoma, linfangioma, linfangioma quístico, osteoma, osteosarcoma, osteocondroma, exostosis cartilaginosa, condroma, condrosarcoma, tumores de células gigantes, sarcoma de Ewing, tumores odontogénicos, cementoblastoma, ameloblastoma, craneofaringioma, gliomas, oligoastrocitomas mixtos, ependimoma, astrocitomas, glioblastomas, oligodendrogliomas, neoplasias neuroepiteliomatosas, neuroblastoma, retinoblastoma, meningiomas, neurofibroma, neurofibromatosis, schwannoma, neurinoma, neuromas, tumores de células granulares, sarcomas de partes blandas alveolares, linfomas, linfoma no de Hodgkin, linfosarcoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma linfocítico pequeño, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células del manto, linfoma de efusión primaria, linfoma de células grandes mediastinales (tímico), linfoma de linfocitos B grande difuso, linfoma de linfocitos B grande intravascular, linfoma de Burkitt, linfoma de zona marginal esplénica, linfoma folicular, linfoma de linfocitos B de zona marginal extranodal de tejido linfoide asociado a mucosa (linfoma MALT), linfoma de linfocitos B de zona marginal nodal, micosis fungoide, síndrome de Sezari, linfoma de linfocitos T periféricos, linfoma de linfocitos T angioinmunoblásticos, linfoma de linfocitos T de tipo paniculitis subcutánea, linfoma de células grandes anaplásicas, linfoma de linfocitos T hepatoesplénicos, linfoma de linfocitos T de tipo enteropatía, papulosis linfomatoide, linfoma de células grandes anaplásicas cutáneas primarias, linfoma de linfocitos T/NK extranodales, linfoma de linfocitos NK blásticos, plasmacitoma, mieloma múltiple, mastocitoma, sarcoma de mastocitos, mastocitosis, leucemia de mastocitos, histiocitosis de células de langerhans, sarcoma histiocítico, sarcoma de células de langerhans, sarcoma de células dendríticas, sarcoma de células dendríticas foliculares, macroglobulinemia de Waldenstrom, granulomatosis linfomatoide, leucemia aguda, leucemia linfocítica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto, leucemia de células plasmáticas, leucemia linfocítica granular grande de linfocitos T, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, leucemia prolinfocítica de linfocitos T, leucemia linfoblástica de B precursor, leucemia linfoblástica de T precursor, leucemia eritroide aguda, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia mielóide, leucemia mielógena, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia basófila, leucemia eosinófila, leucemia basófila aguda, leucemia mielóide aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia monocítica, leucemia monoblástica y monocítica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia mielóide aguda y síndrome mielodisplásico, cloroma o sarcoma mielóide, panmielosis aguda con mielofibrosis, leucemia de tricoleucitos, leucemia mielomonocítica juvenil, leucemia de linfocitos NK agresiva, policitemia vera, enfermedad mieloproliferativa, mielofibrosis idiopática crónica, trombocitemia esencial, leucemia neutrófila crónica, síndrome hipereosinofílico/leucemia eosinófila crónica, trastorno linfoproliferativo postransplante, enfermedad mieloproliferativa crónica, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, leucemia mielomonocítica crónica y síndrome mielodisplásico.

Como se desvela en el presente documento, la enfermedad hiperproliferativa o cáncer puede tratarse después de su diagnóstico inicial o posteriormente por ácidos nucleicos terapéuticos u otras terapias o combinación de dos o más terapias. Una recurrencia de cáncer o enfermedad hiperproliferativa puede definirse como la reaparición o rediagnóstico de un paciente que tiene cualquier enfermedad hiperproliferativa o cáncer después de cualquier tratamiento incluyendo uno o más de cirugía, radioterapia o quimioterapia. No es necesario que se haya indicado que un paciente con enfermedad recidivante haya estado libre de enfermedad, sino únicamente que el paciente ha mostrado enfermedad hiperproliferativa o crecimiento canceroso renovado después de algún grado de respuesta clínica por la primera terapia. La respuesta clínica puede ser, pero sin limitación, enfermedad estable, regresión tumoral, necrosis tumoral, ausencia de cáncer demostrable, reducción del tamaño o carga tumoral, bloqueo del crecimiento tumoral, reducción del dolor asociado a tumor, reducción de la patología asociada a tumor, reducción de los síntomas asociados a tumor, ausencia de progresión tumoral, intervalo sin enfermedad aumentado, tiempo hasta la progresión aumentado, inducción de remisión, reducción o metástasis, o supervivencia del paciente aumentada.

**B. Carcinoma de células escamosas**

En particular, el tumor puede ser carcinoma de células escamosas (SCCHN), más particularmente, SCCHN recurrente. SCCHN recurrente es uno de los cánceres más terribles. Estos tumores tienen tasas de mortalidad muy altas y provocan graves sufrimientos. Los tumores de SCCHN recurrentes y terapias convencionales dan como resultado la desfiguración del paciente y morbilidades significativas que impiden funciones fundamentales como comer, tragar y respirar. Los pacientes requieren con frecuencia medidas invasivas como tubos de alimentación y traqueotomías para soportar la nutrición y respiración. Desafortunadamente, las terapias actuales para esta enfermedad son tristemente inadecuadas y dan como resultado toxicidad considerable que con frecuencia empeora las morbilidades tumorales. La mayoría de los pacientes no responden a terapias convencionales y la mediana de la supervivencia es solamente de 4 a 6 meses. Todas las quimioterapias utilizadas en el tratamiento (metotrexato,

cisplatino, 5FU y los taxanos) pueden dar como resultado mucositis oral que puede empeorar las morbilidades tumorales. Aunque el anticuerpo monoclonal Erbitux® no induce estomatitis, puede producir erupciones cutáneas y aumentar los efectos secundarios de necrosis por radiación.

- 5 Además de los malos perfiles de seguridad de los tratamientos convencionales, las respuestas son típicamente de duraciones cortas y la necesidad de terapias adicionales es casi universal. Por lo tanto, el SCCHN recurrente representa claramente una afección médica con necesidades no satisfechas urgentes que requiere terapias adicionales preferentemente con agentes que no producen toxicidades que aumenten las morbilidades tumorales.

### 10 C. Terapia génica de p53

También se desvela terapia génica de p53. La terapia génica de p53 humana se ha descrito en la bibliografía desde mediados de los años 90. Roth *et al.* (1996) informaron sobre terapia basada en retrovirus y Clayman *et al.* (1998) describieron suministro adenoviral. Las patentes de Estados Unidos 5.747.469, 6.017.524; 6.143.290; 6.410.010; y 6.511.847, solicitud de Estados Unidos 2002/0077313 y solicitud de Estados Unidos 2002/0006914 describen cada uno métodos para tratar a pacientes con p53.

Se contempla el suministro local, regional (juntos locorregional) o sistémico de construcciones de expresión a pacientes. Se propone que este enfoque proporcionará beneficios clínicos, definidos en general como cualquiera de los siguientes: reducción del tamaño tumoral primario, reducción de la aparición o el tamaño de la metástasis, reducción o detención del crecimiento tumoral, inducción de remisión, aumento de la duración antes de la reaparición, reducción del dolor asociado a tumor, inhibición de la división de células tumorales, destrucción de una célula tumoral, inducción de apoptosis en una célula tumoral, reducción o eliminación de reaparición tumoral y/o aumento de la supervivencia del paciente.

En particular, la terapia génica de p53 es Advexin®. Advexin® es eficaz como un único agente y su actividad antitumoral se correlaciona con la expresión de proteína p53 suministrada por Advexin® que da como resultado alteraciones posteriores en la expresión de genes sensibles a p53. Estos genes y sus productos génicos influyen en una amplia serie de procesos celulares que conducen a efectos antitumorales. El entendimiento de la naturaleza de estos procesos es crítico para interpretar los tipos de respuestas clínicas que se observan después de tratamiento con Advexin®.

Advexin® es uno de los primeros agentes antineoplásicos que induce senescencia celular como un mecanismo clave de acción. La inducción de la senescencia celular da como resultado “detención del ciclo celular permanente” y se observa después de restauración transitoria de la actividad de p53 en tumores con p53 inactivada. Clínicamente, la inducción de detención del ciclo celular permanente se asociaría con la estabilización del crecimiento tumoral en lugar de reducciones del tamaño tumoral. Los modelos tumorales animales y ensayos clínicos humanos han confirmado claramente la activación de la detención del ciclo celular/senescencia después de terapia de Advexin®. p53 también activa mecanismos antiangiogénicos que también se asocian con la estabilización de crecimiento tumoral en lugar de reducciones de tamaño tumoral. Como alternativa, la apoptosis o “muerte celular programada” es otra ruta clave activada por restauración de p53. Con respecto a respuestas tumorales clínicas, se esperaría que la inducción de apoptosis diera como resultado reducciones del tamaño tumoral después de terapia de Advexin®. Estos mecanismos de supresión de tumores de p53 clave y sus mediadores moleculares se ilustran en la FIG. 1.

Típicamente, las tres rutas terapéuticas (detención del ciclo celular- apoptosis- antiangiogénesis) se inducen dentro de un tumor después de la restauración de la actividad de p53. Las células tumorales individuales pueden activar la detención del ciclo celular/senescencia o rutas de apoptosis y los factores que determinan qué ruta se desencadena para una célula particular no están claros en la actualidad. Dependiendo de cuál de estos mecanismos se induzca predominantemente dentro de las células tumorales se determinará la naturaleza de las respuestas clínicas observadas después de terapia de Advexin®. Como se representa en un diagrama en la FIG. 2, se espera que un espectro de respuestas antitumorales varíe de estabilización de crecimiento tumoral hasta erradicación tumoral completa, incluyendo senescencia/enfermedad estable (FIG. 3) y apoptosis/reducción tumoral (FIG. 4), dependiendo de la proporción relativa de células que activan las rutas de senescencia celular o apoptosis.

De forma coherente con estas consideraciones de mecanismos terapéuticos, hay un corpus de datos creciente que indica que los criterios de respuestas tumorales convencionales basados en reducciones completa (RC) y parcial (RP) del tamaño de > 50 % no identifican de forma óptima respuestas clínicamente relevantes asociadas con aumento de la supervivencia (Lara *et al.*, 2008). Lara *et al.* (2008) indicaron recientemente resultados de tres ensayos clínicos de grupo de oncología sudoccidental controlados, aleatorios, que implicaban 984 pacientes con cáncer de pulmón que indicaban que el control de crecimiento tumoral (CCT) definido por RC, RP o enfermedad estable era significativamente superior a las definiciones de RC + RP convencionales para predecir la supervivencia. De forma similar, Choi y colaboradores (2007) demostraron que una reducción  $\geq 10$  % en el tamaño tumoral por tomografía computarizada (TC) estaba altamente correlacionada con la respuesta tumoral mediante tomografía de emisión de positrones (PET) y era un predictor más sensible del beneficio de supervivencia que los criterios de respuestas convencionales en tumores del estroma gastrointestinal tratados con imatinib (Choi, 2007; Benjamin, 2007).

Por lo tanto, para agentes como Advexin® que se sabe que inducen detención del ciclo celular y senescencia como mecanismos importantes de acción, las definiciones de respuestas tumorales basadas en el control del crecimiento de tumores (CCT = RC + RP + EE) o reducciones de tamaño tumoral de  $\geq 10\%$  son más apropiadas para definir respuestas tumorales que predican aumento de la supervivencia después del tratamiento.

5

### III. Genes terapéuticos

Se desvela también un método para administrar al paciente una terapia génica de p53, una terapia distinta de terapia génica de p53 o una segunda terapia antitumoral basada en el perfil de biomarcadores de p53 del paciente. El método puede usar ácidos nucleicos terapéuticos en ciertos aspectos, y gen de p53 en particular en la terapia génica de p53.

10

#### A. Ácidos nucleicos terapéuticos

Se define en el presente documento que un "ácido nucleico terapéutico" hace referencia a un ácido nucleico que puede administrarse a un sujeto para el fin de tratar o prevenir una enfermedad. El ácido nucleico del presente documento es uno que se sabe o se sospecha que es beneficioso en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa. Puede surgir el beneficio terapéutico, por ejemplo, como resultado de la alteración de la expresión de un gen o genes particulares por el ácido nucleico. La alteración de la expresión de un gen o genes particulares puede ser inhibición o aumento de la expresión de un gen particular. También se desvela la administración de un ácido nucleico terapéutico.

15

20

25

30

Un "ácido nucleico" como se usa en el presente documento se referirá en general a una molécula (es decir, una cadena) de ADN, ARN o un derivado o análogo del mismo, que comprende una base nucleotídica. Una base nucleotídica incluye, por ejemplo, una base purínica o pirimidínica de origen natural hallada en ADN (por ejemplo, una adenina "A," una guanina "G," una timina "T" o una citosina "C") o ARN (por ejemplo, una A, una G, un uracilo "U" o una C). La expresión "ácido nucleico" abarca los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido," cada uno como un subgénero de la expresión "ácido nucleico". El término "oligonucleótido" se refiere a una molécula de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 100 bases nucleotídicas de longitud. El término "polinucleótido" se refiere a al menos una molécula de más de aproximadamente 100 bases nucleotídicas de longitud.

En ciertas realizaciones, un "gen" se refiere a un ácido nucleico que se transcribe. En ciertos aspectos, el gen incluye secuencias reguladoras implicadas en la transcripción o la producción de un mensaje. En realizaciones particulares, un gen comprende secuencias transcritas que codifican una proteína, un polipéptido o un péptido. Como entenderán los expertos en la materia, este término funcional "gen" incluye secuencias genómicas, secuencias de ARN o ADNc o segmentos de ácido nucleico más pequeños modificados técnicamente, incluyendo segmentos de ácido nucleico de una parte no transcrita de un gen, incluyendo pero sin limitación las regiones promotoras o potenciadoras no transcritas de un gen. Los segmentos de ácido nucleico más pequeños modificados técnicamente pueden expresar, o pueden adaptarse para expresar proteínas, polipéptidos, dominios polipeptídicos, péptidos, proteínas de fusión, polipéptidos mutantes y/o similares.

35

40

45

"Aislado sustancialmente de otras secuencias codificantes" significa que el gen de interés forma parte de la región codificante del segmento de ácido nucleico y que el segmento no contiene grandes partes de ácido nucleico codificante de origen natural, tales como fragmentos cromosómicos grandes u otros genes funcionales o regiones codificantes de ADNc. Por supuesto, esto se refiere a ácido nucleico como se aisló originalmente, y no excluye genes o regiones codificantes añadidas más tarde al ácido nucleico por la mano del hombre.

Como se desvela en el presente documento, el ácido nucleico terapéutico puede estar en forma de una "construcción de expresión" de ácido nucleico. A lo largo de la presente solicitud, se entiende que la expresión "construcción de expresión" incluye cualquier tipo de ácido nucleico en el que todo o parte del ácido nucleico sea capaz de transcribirse. La parte transcrita puede codificar un gen terapéutico capaz de traducirse a un producto génico terapéutico tal como una proteína, pero no es necesario que lo sea.

50

55

La parte transcrita puede actuar simplemente para inhibir o aumentar la expresión de un gen particular.

Como se desvela en el presente documento, el ácido nucleico terapéutico puede codificar un "gen terapéutico". Como entenderán los expertos en la materia, la expresión "gen terapéutico" incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc y segmentos génicos modificados técnicamente más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión y mutantes, todos los cuales son capaces de proporcionar un beneficio clínico a un paciente que padece una enfermedad hiperproliferativa. El ácido nucleico terapéutico que codifica un gen terapéutico puede comprender una secuencia de ácido nucleico contigua de aproximadamente 5 a aproximadamente 20.000 o más nucleótidos, nucleósidos o pares de bases.

60

Los pacientes con tumores no resecables pueden tratarse de acuerdo con la presente divulgación. Como consecuencia, el tumor puede reducirse de tamaño, o la vasculatura tumoral puede cambiar de modo que el tumor

65

se haga resecable. Si fuera así, puede permitirse resección quirúrgica convencional. Otro modo particular de administración que puede usarse junto con cirugía es el tratamiento de un lecho tumoral operativo. Por lo tanto, en el tratamiento de terapia génica primaria, o en un tratamiento posterior, se puede perfundir el lecho tumoral resecado con el vector durante la cirugía, y después de la cirugía, opcionalmente insertando un catéter en el sitio de cirugía.

## B. Purificación y expresión de ácidos nucleicos

Un ácido nucleico puede purificarse en geles de poliacrilamida, gradientes de centrifugación de cloruro de cesio, cromatografía en columna o por cualquier otro medio conocido por un experto habitual en la materia (véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001, incorporado en el presente documento por referencia).

También se desvela un ácido nucleico que es un ácido nucleico aislado. Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARN o ADN) que se ha aislado de, o está de otro modo libre de, la mayoría de componentes celulares o componentes de reacción *in vitro*, y/o la mayoría de los ácidos nucleicos genómicos y transcritos totales de una o más células. Los expertos en la materia conocen bien métodos para aislar ácidos nucleicos (por ejemplo, centrifugación de densidad en equilibrio, separación electroforética, cromatografía en columna).

En el contexto de la presente divulgación, será deseable producir proteínas terapéuticas en una célula diana. La expresión típicamente requiere que se proporcionen señales apropiadas en los vectores o casetes de expresión, y que incluyan diversos elementos reguladores, tales como potenciadores/promotores de fuentes virales y/o de mamífero que conducen la expresión de los genes de interés en células hospedadoras. También pueden incluirse elementos diseñados para optimizar la estabilidad y capacidad de traducción del ARN mensajero en células hospedadoras. Pueden incorporarse marcadores de selección farmacológica para establecer clones de células estables, permanentes.

Los vectores virales son sistemas de expresión eucariotas seleccionados. Se incluyen adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus, herpesvirus, lentivirus y poxvirus incluyendo virus *vaccinia* y virus del papiloma incluyendo SV40. Los vectores virales pueden ser defectuosos en replicación, defectuosos condicionales o competentes en replicación. También se desvelan sistemas de suministro no virales, incluyendo vehículos basados en lípidos.

## C. Vectores y construcciones de expresión

El término "vector" se usa para hacer referencia a una molécula de ácido nucleico transportadora en la que puede insertarse una secuencia de ácido nucleico para introducción en una célula en la que puede replicarse y/o expresarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena" o "heteróloga" lo que significa que es ajena a la célula en la que el vector se introduce o que la secuencia es homóloga de una secuencia de la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en la que la secuencia no se encuentra habitualmente. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus vegetales) y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la materia estará bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes convencionales (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001 y Ausubel *et al.*, 1996).

La expresión "vector de expresión" se refiere a cualquier tipo de construcción genética que comprende un ácido nucleico que codifique un ARN capaz de transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen después a una proteína, un polipéptido o un péptido. Los vectores de expresión pueden contener una diversidad de "secuencias de control", que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante unida operativamente en una célula hospedadora particular. Además de secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que cumplen también otras funciones, como se describe posteriormente.

Para expresar p53 o un gen terapéutico distinto de p53, es necesario proporcionar un vector de expresión. El ácido nucleico apropiado puede insertarse en un vector de expresión mediante técnicas de subclonación convencionales. La manipulación de estos vectores se conoce bien en la técnica. Son ejemplos de sistemas de expresión de proteínas de fusión el sistema de glutatión S-transferasa (Pharmacia, Piscataway, NJ), el sistema de proteína de unión a maltosa (NEB, Beverly, MA), el sistema de FLAG (IBI, New Haven, CT) y el sistema de His 6x (Qiagen, Chatsworth, CA).

Como se desvela en el presente documento, el sistema de expresión usado es uno conducido por el promotor poliédrico de baculovirus. El gen que codifica la proteína puede manipularse por técnicas convencionales para facilitar la clonación en el vector de baculovirus. Un vector de baculovirus particular es el vector pBlueBac (Invitrogen, Sorrento, CA). El vector que porta el gen de interés se transfecta en células *Spodoptera frugiperda* (Sf9) por protocolos convencionales, y las células se cultivan y procesan para producir la proteína recombinante. Las células de mamífero expuestas a baculovirus se infectan y pueden expresar el gen ajeno solamente. De este modo se pueden transducir todas las células y expresar el gen de una manera dependiente de dosis.

También existe una diversidad de vectores eucariotas que proporcionan un vehículo adecuado en el que puede producirse polipéptido recombinante. Se ha usado VHS en cultivo tisular para expresar un gran número de genes exógenos así como para expresión de alto nivel de sus genes endógenos. Por ejemplo, el gen de ovoalbúmina de pollo se ha expresado a partir de VHS usando un promotor  $\alpha$ . Herz y Roizman (1983). El gen *lacZ* también se ha expresado en una diversidad de promotores de VHS.

A lo largo de la presente divulgación, se entiende que la expresión "construcción de expresión" incluye cualquier tipo de construcción genética que contenga un ácido nucleico que codifique un producto génico en el que parte de o toda la secuencia codificante de ácido nucleico es capaz de transcribirse. El transcrito puede traducirse a una proteína, pero no es necesario que lo sea. Por lo tanto, la expresión incluye tanto la transcripción de un gen como la traducción de un ARN en un producto génico.

La expresión también puede incluir solamente transcripción del ácido nucleico.

El ácido nucleico puede estar bajo el control transcripcional de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción específica de un gen. La expresión "bajo control de la transcripción" significa que el promotor está en la localización y orientación correctas en relación con el ácido nucleico para controlar el inicio por ARN polimerasa y la expresión del gen.

El término promotor se usará en el presente documento para hacer referencia a un grupo de módulos de control de la transcripción que se agrupan en torno al sitio de inicio de ARN polimerasa II. Gran parte del razonamiento acerca de cómo los promotores se organizan deriva de análisis de varios promotores virales, incluyendo los de la timidina quinasa (tk) de VHS y unidades de transcripción temprana de SV40. Estos estudios, aumentados por trabajos más recientes, han mostrado que los promotores están compuestos de módulos funcionales discretos, que consisten cada uno en aproximadamente 7-20 pb de ADN, y que contienen uno o más sitios de reconocimiento para proteínas activadoras o represoras de la transcripción.

Al menos un módulo en cada promotor actúa para situar el sitio de inicio para síntesis de ARN. El mejor ejemplo conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de una caja TATA, tal como el promotor para el gen de la desoxinucleotidil transferasa terminal de mamífero y el promotor para los genes tardíos de SV40, un elemento discreto que solapa con el sitio de inicio en sí mismo ayuda a fijar el sitio de inicio.

Elementos promotores adicionales regulan la frecuencia del inicio de la transcripción. Típicamente, estos se localizan en la región 30-110 pb cadena arriba del sitio de inicio, aunque se ha mostrado recientemente que varios promotores contienen elementos funcionales cadena abajo del sitio de inicio también. La separación entre elementos promotores frecuentemente es flexible, de modo que se conserve la función promotora cuando los elementos se inviertan o se muevan entre sí. En el promotor de tk, la separación entre elementos promotores puede aumentarse hasta 50 pb de separación antes de que comience a descender la actividad. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden actuar bien cooperativamente o bien independientemente para activar la transcripción.

No se cree que el promotor particular que se emplea para control de la expresión de un ácido nucleico sea crítico, siempre que sea capaz de expresar el ácido nucleico en la célula diana. Por lo tanto, cuando una célula humana sea diana, lo es particularmente para situar la región codificante de ácido nucleico adyacente a y bajo el control de un promotor que es capaz de expresarse en una célula humana. En general, dicho promotor podría incluir un promotor humano o uno viral.

El promotor de gen temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) humano, el promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de sarcoma de Rous pueden usarse para obtener expresión de alto nivel de transgenes. También se contempla el uso de otros promotores virales o celulares de mamífero o de fagos bacterianos que se conocen bien en la técnica para conseguir la expresión de un transgén, siempre que los niveles de expresión sean suficientes para un fin dado.

Los potenciadores se detectaron originalmente como elementos génicos que aumentaban la transcripción de un promotor localizado en una posición distante en la misma molécula de ADN. Esta capacidad para actuar sobre una larga distancia tuvo pocos precedentes en estudios clásicos de regulación transcripcional procarionta. Trabajos posteriores han mostrado que regiones de ADN con actividad potenciadora se organizan de forma muy similar a los promotores. Es decir, están compuestas de muchos elementos individuales, cada uno de los cuales se une con una o más proteínas de la transcripción.

La distinción básica entre potenciadores y promotores es operativa. Una región potenciadora en su conjunto debe ser capaz de estimular la transcripción a una distancia; esto no es necesariamente cierto para una región promotora o sus elementos componentes. Por otro lado, un promotor debe tener uno o más elementos que dirijan el inicio de la síntesis de ARN a un sitio particular y en una orientación particular, mientras que los potenciadores carecen de estas especificidades. Los promotores y potenciadores son con frecuencia solapantes y contiguos, pareciendo con

frecuencia que tienen una organización modular muy similar.

Adicionalmente cualquier combinación de potenciador/promotor (según la base de datos de promotores eucariotas EPDB) también podría usarse para conducir la expresión de un transgén. El uso de un sistema de expresión citoplasmático T3, T7 o SP6 es otra posible realización. Las células eucariotas pueden soportar la transcripción citoplasmática de ciertos promotores bacterianos si se proporciona la polimerasa bacteriana apropiada, bien como parte del complejo de suministro o como una construcción de expresión genética adicional.

Se incluirá típicamente una señal de poliadenilación para efectuar poliadenilación apropiada del transcrito. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica exitosa de la invención, y puede emplearse cualquiera de dichas secuencias. Las realizaciones particulares incluyen la señal de poliadenilación de SV40 y la señal de poliadenilación de hormona del crecimiento bovina, conveniente y que se sabe que actúan bien en diversas células diana. También se contempla como un elemento del casete de expresión un terminador. Estos elementos pueden actuar para potenciar los niveles de mensaje y para minimizar la lectura desde el casete a otras secuencias.

También puede requerirse una señal de inicio específica para traducción eficaz de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales de control de la traducción exógenas, incluyendo el codón de inicio ATG. Un experto habitual en la materia sería capaz fácilmente de determinarlo y proporcionar las señales necesarias. Se sabe bien que el codón de inicio debe estar "en fase" con la fase de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Las señales de control de la traducción exógenas y codones de inicio pueden ser naturales o sintéticos. La eficacia de expresión puede potenciarse por la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados (Bittner *et al.*, 1987).

Como se desvela en el presente documento, la construcción de expresión puede comprender un virus o construcción modificada técnicamente derivada de un genoma viral. La capacidad de ciertos virus para entrar en células mediante endocitosis mediada por receptor y de integrarse en el genoma de la célula hospedadora y expresar genes virales de forma estable y eficazmente los han hecho candidatos atractivos para la transferencia de genes ajenos a células de mamífero (Ridgeway, 1988; Nicolas y Rubenstein, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Temin, 1986). Los primeros virus usados como vectores fueron virus de ADN incluyendo los papovavirus (virus de simio 40, virus del papiloma bovino y polioma) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986) y adenovirus (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986) y virus adenoasociados. Los retrovirus también son vehículos de transferencia génica atractivos (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986) como lo son virus *vaccinia* (Ridgeway, 1988) y virus adenoasociados (Ridgeway, 1988). Dichos vectores pueden usarse para (i) transformar líneas celulares *in vitro* para el fin de expresar proteínas de interés o (ii) para transformar células *in vitro* o *in vivo* para proporcionar polipéptidos terapéuticos en un escenario de terapia génica.

#### a. Vectores virales

Los vectores virales son un tipo de construcción de expresión que utiliza secuencias virales para introducir ácido nucleico y posiblemente proteínas en una célula. La capacidad de ciertos virus para infectar células o entrar en células mediante endocitosis mediada por receptor y para integrarse en el genoma de la célula hospedadora y expresar genes virales de forma estable y eficazmente los han hecho candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos ajenos a células (por ejemplo, células de mamífero). Los componentes de vectores como se desvela en el presente documento, pueden ser un vector viral que codifica una o más sustancias candidatas u otros componentes tales como, por ejemplo, un inmunomodulador o adyuvante para la sustancia candidata. Se describen posteriormente ejemplos no limitantes de vectores virales que pueden usarse para suministrar un ácido nucleico de la presente invención.

El adenovirus es un virus de ADN bicatenario sin envoltura. El virión consiste en un núcleo de proteína-ADN dentro de una cápsida proteica. Los viriones se unen con un receptor celular específico, se endocitan, y el genoma se extruye de endosomas y se transporta al núcleo. El genoma es de aproximadamente 36 kB, y codifica aproximadamente 36 genes. En el núcleo, las proteínas E1A "tempranas inmediatas" se expresan inicialmente, y estas proteínas inducen la expresión de las proteínas "tempranas retardadas" codificadas por las unidades de transcripción E1B, E2, E3 y E4. Los viriones se ensamblan en el núcleo aproximadamente 1 día después de la infección (p.i.) y después de 2-3 días la célula se lisa y libera virus descendiente. La lisis celular está mediada por la proteína de 11,6 K o E3, que se ha renombrado "proteína de muerte de adenovirus" (ADP).

El adenovirus es particularmente adecuado para su uso como un vector de transferencia génica debido a su genoma de tamaño medio, facilidad de manipulación, alto título, amplia variedad de células diana y alta infecciosidad. Ambos extremos del genoma viral contienen repeticiones invertidas (ITR) de 100-200 pares de bases, que son elementos *cis* necesarios para la replicación y el empaquetamiento de ADN viral. Las regiones temprana (E) y tardía (L) del genoma contienen diferentes unidades de transcripción que se dividen por la aparición de replicación de ADN viral. La región E1 (E1A y E1B) codifica proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma viral y algunos genes celulares. La expresión de la región E2 (E2A y E2B) da como resultado la síntesis de las proteínas

para replicación de ADN viral. Estas proteínas están implicadas en replicación de ADN, expresión de genes tardíos e inactivación de células hospedadoras (Renan, 1990). Los productos de los genes tardíos, incluyendo la mayoría de las proteínas de cápsida viral, se expresan solamente después de procesamiento significativo de un único transcrito primario producido por el promotor tardío mayor (MLP). El MLP (localizado a 16,8 u.m.) es particularmente eficaz durante la fase tardía de infección, y todos los ARNm producidos a partir de este promotor poseen una secuencia líder tripartita 5' (TPL) que los hace ARNm particulares para traducción.

El adenovirus puede ser cualquiera de los 51 serotipos conocidos diferentes o subgrupos A-F. El adenovirus de tipo 5 del subgrupo C es el adenovirus humano acerca del cual se conoce más información bioquímica y genética, y se ha usado históricamente para la mayoría de construcciones que emplean adenovirus como un vector. Se genera con frecuencia adenovirus recombinante a partir de recombinación homóloga entre vector lanzadera y vector de provirus. Debido a la posible recombinación entre dos vectores provirales, puede generarse adenovirus de tipo silvestre a partir de este proceso. Por lo tanto, es crítico aislar un único clon de virus de una placa individual y examinar su estructura genómica.

Los virus usados en la terapia génica pueden ser competentes para replicación o deficientes en replicación. La generación y propagación de los vectores adenovirales que son deficientes en replicación dependen de una línea celular auxiliar, siendo el prototipo células 293, preparadas transformando células de riñón embrionario humano con fragmentos de ADN de Ad5; esta línea celular expresa de forma constitutiva proteínas E1 (Graham *et al.*, 1977). Sin embargo, también pueden derivar líneas celulares auxiliares de células humanas tales como células de riñón embrionario humano, células musculares, células hematopoyéticas u otras células mesenquimales o epiteliales embrionarias humanas. Como alternativa, las células auxiliares pueden derivar de las células de otra especie de mamífero que sean permisivas para adenovirus humanos. Dichas células incluyen, por ejemplo, células Vero u otras células mesenquimales o epiteliales embrionarias de mono. Como se ha indicado anteriormente, la línea celular auxiliar particular es 293.

Racher *et al.* (1995) han desvelado métodos mejorados para cultivar células 293 y propagar adenovirus. En un formato, se cultivan agregados celulares naturales inoculando células individuales en matraces de agitación con silicona de 1 litro (Techne, Cambridge, Reino Unido) que contienen 100-200 ml de medio. Después de agitar a 40 rpm, la viabilidad celular se estima con azul de tripano. En otro formato, se emplean microvehículos de Fibra-Cel (Bibby Sterlin, Stone, Reino Unido) (5 g/l) de la siguiente manera. Se añade un inóculo celular, resuspendido en 5 ml de medio, al vehículo (50 ml) en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml, y se deja en reposo, con agitación ocasional, durante de 1 a 4 horas. El medio se reemplaza después con 50 ml de medio nuevo y se inicia la agitación. Para producción de virus, se permite que las células crezcan hasta aproximadamente 80 % de confluencia, después de lo cual el medio se reemplaza (hasta 25 % del volumen final) y se añade adenovirus a una MOI de 0,05. Los cultivos se dejan reposar durante una noche, después de lo cual el volumen se aumenta hasta 100 % y comienza la agitación durante otras 72 h.

Los expertos en la materia conocen crecimiento y manipulación de adenovirus, y este muestra una amplia variedad de hospedadores *in vitro* e *in vivo*. Este grupo de virus puede obtenerse en altos títulos, por ejemplo,  $10^9$ - $10^{13}$  unidades formadoras de placas por ml, y son altamente infecciosos. El ciclo de vida de adenovirus no requiere integración en el genoma de la célula hospedadora. Los genes ajenos suministrados por vectores adenovirales son episómicos y, por lo tanto, tienen baja genotoxicidad para células hospedadoras. No se han presentado efectos secundarios en estudios de vacunación con adenovirus de tipo silvestre (Couch *et al.*, 1963; Top *et al.*, 1971), lo que demuestra su seguridad y potencial terapéutico como vectores de transferencia génica *in vivo*.

Se han usado vectores de adenovirus en expresión génica eucariota (Levrero *et al.*, 1991; Gomez-Foix *et al.*, 1992) y desarrollo de vacunas (Grunhaus y Horwitz, 1992; Graham y Prevec, 1992). Los estudios animales han sugerido que podrían usarse adenovirus recombinantes para terapia génica (Stratford-Perricaudet y Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet *et al.*, 1990; Rich *et al.*, 1993). Los estudios de la administración de adenovirus recombinante a diferentes tejidos incluyen instilación en la tráquea (Rosenfeld *et al.*, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1992), inyección muscular (Ragot *et al.*, 1993), inyecciones intravenosas periféricas (Herz y Gerard, 1993) e inoculación estereotáctica en el cerebro (Le Gal La Salle *et al.*, 1993).

Como se ha indicado anteriormente, los vectores de Ad se basan en Ad recombinantes que son defectuosos en replicación o competentes en replicación. Los vectores Ad defectuosos en replicación típicos carecen de los genes E1A y E1B (conocidos colectivamente como E1) y contienen en su lugar un casete de expresión que consiste en un promotor y señales de procesamiento pre ARNm que conducen la expresión de un gen ajeno. Estos vectores son incapaces de replicar debido a que carecen de los genes E1A requeridos para introducir expresión génica de Ad y replicación de ADN. Además, los genes de E3 pueden suprimirse porque no son esenciales para la replicación viral en células cultivadas. Se reconoce en la técnica que los vectores Ad defectuosos en replicación tienen varias características que los hacen subóptimos para su uso en terapia. Por ejemplo, la producción de vectores defectuosos en replicación requiere que se cultiven en una línea celular complementaria que proporciona las proteínas E1A en *trans*.

También se han propuesto varios grupos que usan vectores Ad competentes en replicación para uso terapéutico.

Los vectores competentes en replicación conservan genes Ad esenciales para replicación y por lo tanto no requieren líneas celulares complementarias para replicar. Los vectores Ad competentes en replicación lisan células como una parte natural del ciclo de vida del vector. Una ventaja de los vectores Ad competentes en replicación aparece cuando el vector se modifica técnicamente para codificar y expresar una proteína ajena. Se esperaría que dichos vectores amplificaran en gran medida la síntesis de la proteína codificada *in vivo* a medida que se replica el vector. Para su uso como agentes antineoplásicos, los vectores virales competentes en replicación teóricamente serían ventajosos porque se replicarían y se propagarían por todo el tumor, no solamente en las células infectadas inicialmente como sucede con vectores defectuosos en replicación.

Otro enfoque más es crear virus que son competentes en replicación de forma condicional. Onyx Pharmaceuticals informaron recientemente sobre vectores antineoplásicos basados en adenovirus que son deficientes en replicación en células no neoplásicas, pero que muestran un fenotipo de replicación en células neoplásicas que carecen de proteínas supresoras de tumores p53 funcional y/o de retinoblastoma (pRB) (patente de Estados Unidos 5.677.178). Se ha indicado que este fenotipo se consigue usando adenovirus recombinantes que contiene una mutación en la región E1B que hace a la proteína E1B-55K codificada incapaz de unirse con p53 y/o una mutación o mutaciones en la región E1A que hacen a la proteína E1A codificada (p289R o p243R) incapaz de unirse con pRB y/o p300 y/o p107. E1B-55K tiene al menos dos funciones independientes: se une con e inactiva la proteína supresora de tumores p53, y se requiere para transporte eficaz de ARNm de Ad del núcleo. Debido a que estas proteínas virales E1B y E1A están implicadas en forzar las células a pasar a fase S, que se requiere para replicación de ADN adenoviral, y debido a que las proteínas p53 y pRB bloquean la progresión del ciclo celular, los vectores adenovirales recombinantes descritos por Onyx deberían replicar en células defectuosas en p53 y/o pRB, lo que sucede para muchas células cancerosas, pero no en células con p53 y/o pRB de tipo silvestre.

Otro vector adenoviral competente en replicación tiene el gen para E1B-55K reemplazado con el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wilder *et al.*, 1999a). El grupo que construyó este vector indicó que la combinación del vector más ganciclovir mostraba un efecto terapéutico en un cáncer de colon humano en un modelo de ratón desnudo (Wilder *et al.*, 1999b). Sin embargo, este vector carece del gen para ADP y, en consecuencia, el vector lisará células y se propagará de célula a célula menos eficazmente que un vector equivalente que exprese ADP.

También se pueden aprovechar diversos sistemas promotores para crear vectores adenovirales que sobreexpresen p53. Los vectores también pueden ser competentes en replicación o condicionalmente replicativos. Otras versiones de adenovirus modificados técnicamente incluyen alteración de la capacidad de E1A para unirse con p300 y/o miembros de los miembros de la familia de Rb, o vectores Ad que carecen de expresión de al menos una proteína E3 seleccionada del grupo que consiste en 6,7K, gp19K, RID $\alpha$  (también conocida como 10,4K); RID $\beta$  (también conocida como 14,5K) y 14,7K. Debido que las proteínas E3 de tipo silvestre inhiben la inflamación mediada por inmunidad y/o apoptosis de células infectadas por Ad, un adenovirus recombinante que carece de una o más de estas proteínas E3 puede estimular la infiltración de células inflamatorias e inmunitarias en un tumor tratado con el adenovirus y que esta respuesta inmunitaria del hospedador ayudará a la destrucción del tumor así como tumores que se han metastatizado. Una mutación en la región E3 perjudicaría su función de tipo silvestre, haciendo a la célula infectada por virus susceptible al ataque por el sistema inmunitario del hospedador. Estos virus se describen en detalle en la patente de Estados Unidos 6.627.190.

Otros vectores adenovirales se describen en las patentes de Estados Unidos 5.670.488; 5.747.869; 5.932.210; 5.981.225; 6.069.134; 6.136.594; 6.143.290; 6.210.939; 6.296.845; 6.410.010; y 6.511.184; publicación de Estados Unidos n.º 2002/0028785.

Virus oncolíticos también se desvelan en el presente documento como vectores. Los virus oncolíticos se definen en el presente documento para hacer referencia en general a virus que destruyen células tumorales o cancerosas con más frecuencia de la que destruyen células normales. Los virus oncolíticos ejemplares incluyen adenovirus que sobreexpresan ADP. Estos virus se analizan en detalle en la solicitud de patente de Estados Unidos 20040213764, solicitud de patente de Estados Unidos 20020028785, y solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 09/351.778.

Se analizan virus oncolíticos ejemplares en otra parte de la presente memoria descriptiva. Un experto en la materia estaría familiarizado con otros virus oncolíticos que pueden aplicarse en las composiciones farmacéuticas y métodos en el contexto de la presente divulgación.

El virus adenoasociado (AAV) es un sistema de vector atractivo para su uso en los métodos como se desvela en el presente documento ya tiene una alta frecuencia de integración y puede infectar a células que no están en división, haciéndolo por lo tanto útil para suministro de genes en células de mamífero, por ejemplo, en cultivo tisular (Muzyczka, 1992) o *in vivo*. AAV tiene una amplia variedad de hospedadores para infectividad (Tratschin *et al.*, 1984; Laughlin *et al.*, 1986; Lebkowski *et al.*, 1988; McLaughlin *et al.*, 1988). Se describen detalles con respecto a la generación y el uso de vectores rAAV en las patentes de Estados Unidos 5.139.941 y 4.797.368.

Los retrovirus son prometedores como vectores terapéuticos debido a su capacidad para integrar sus genes en el

genoma hospedador, transfiriendo una gran cantidad de material genético ajeno, infectando un amplio espectro de especies y tipos celulares y de empaquetarse en líneas celulares especiales (Miller, 1992).

Para construir un vector retroviral, se inserta un ácido nucleico en el genoma viral en el lugar de ciertas secuencias virales para producir un virus que es defectuoso en replicación. Para producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes *gag*, *pol* y *env* pero sin los componentes de empaquetamiento y LTR (Mann *et al.*, 1983). Cuando se introduce un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con las secuencias de empaquetamiento y LTR retrovirales en una línea celular especial (por ejemplo, mediante precipitación con fosfato de calcio), la secuencia de empaquetamiento permite que el transcrito de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas virales, que después se secretan al medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). El medio que contiene los retrovirus recombinantes después se recoge, opcionalmente se concentra y se usa para transferencia génica. Los vectores retrovirales son capaces de infectar una amplia diversidad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y expresión estable requieren la división de células hospedadoras (Paskind *et al.*, 1975).

Los lentivirus son retrovirus complejos, que, además de los genes retrovirales comunes *gag*, *pol* y *env*, contienen otros genes con función reguladora o estructural. Se conocen bien en la técnica vectores lentivirales (véase, por ejemplo, Naldini *et al.*, 1996; Zufferey *et al.*, 1997; Blomer *et al.*, 1997; patentes de Estados Unidos 6.013.516 y 5.994.136).

Los vectores lentivirales recombinantes son capaces de infectar células que no están en división y pueden usarse para transferencia génica tanto *in vivo* como *ex vivo* y expresión de secuencias de ácido nucleico. Por ejemplo, se describe un lentivirus recombinante capaz de infectar una célula que no está en división en la que una célula hospedadora adecuada se transfecta con dos o más vectores que portan las funciones de empaquetamiento, concretamente *gag*, *pol* y *env*, así como *rev* y *tat* en la patente de Estados Unidos 5.994.136, incorporada en el presente documento por referencia. Se puede dirigir el virus recombinante por enlace de la proteína de envoltura con un anticuerpo o un ligando particular para dirigirse a un receptor de un tipo celular particular. Insertando una secuencia (incluyendo una región reguladora) de interés en el vector viral, junto con otro gen que codifica el ligando para un receptor en una célula diana específica, por ejemplo, el vector es ahora específico de diana.

El virus del herpes simple (VHS) ha generado considerable interés en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso debido a su tropismo para células neuronales, pero este vector también puede aprovecharse para otros tejidos dado su amplia variedad de hospedadores. Otro factor que hace al VHS un vector atractivo es el tamaño y organización del genoma. Debido a que el VHS es grande, la incorporación de múltiples genes o casetes de expresión es menos problemática que en otros sistemas virales más pequeños. Además, la disponibilidad de diferentes secuencias de control viral con diverso rendimiento (temporal, fuerza, etc.) hace posible controlar la expresión en un mayor grado que en otros sistemas. También es una ventaja que el virus tenga relativamente pocos mensajes cortados, facilitando adicionalmente las manipulaciones genéticas.

El VHS también es relativamente fácil de manipular y puede cultivarse hasta altos títulos. Por lo tanto, el suministro es un menor problema, tanto con respecto a volúmenes necesarios para conseguir suficiente MOI como con respecto a una menor necesidad de dosificaciones repetidas. Para una revisión del VHS como un vector de terapia génica, véase Glorioso *et al.* (1995).

El VHS, designado con los subtipos 1 y 2, son virus con envoltura que están entre los agentes infecciosos más comunes encontrados por seres humanos, infectando a millones de sujetos humanos en todo el mundo. El genoma de ADN bicatenario, complejo, grande, codifica docenas de diferentes productos génicos, algunos de los cuales derivan de transcritos cortados y empalmados. Además de componentes estructurales de virión y envoltura, el virus codifica numerosas otras proteínas incluyendo una proteasa, una ribonucleótido reductasa, una ADN polimerasa, una proteína de unión a ADNmc, una helicasa/primasa, una ATPasa dependiente de ADN, una dUTPasa y otras.

Los genes del VHS forman varios grupos cuya expresión está regulada de forma coordinada y ordenada secuencialmente en cascada (Honesty y Roizman, 1974; Honess y Roizman 1975). La expresión de genes  $\alpha$ , el primer conjunto de genes para expresar después de la infección, está potenciada por la proteína de virión número 16, o factor  $\alpha$  transductor (Post *et al.*, 1981; Batterson y Roizman, 1983). La expresión de genes  $\beta$  requiere productos génicos  $\alpha$  funcionales, más notablemente ICP4, que está codificado por el gen  $\alpha 4$  (DeLuca *et al.*, 1985). Los genes  $\gamma$ , un grupo heterogéneo de genes que codifican principalmente proteínas estructurales de viriones, requieren la aparición de síntesis de ADN viral para expresión óptima (Holland *et al.*, 1980).

En línea con la complejidad del genoma, el ciclo de vida del VHS es bastante complicado. Además del ciclo lítico, que da como resultado la síntesis de partículas virales y, con el tiempo, muerte celular, el virus tiene la capacidad de entrar en un estado latente en el que el genoma se mantiene en ganglios neuronales hasta que alguna señal aún indefinida desencadena una reaparición del ciclo lítico. Se han desarrollado variantes avirulentas de VHS y están disponibles fácilmente para su uso en contextos de terapia génica (patente de Estados Unidos 5.672.344).

Se han usado vectores de virus *vaccinia* de forma extensiva debido a la facilidad de su construcción, niveles

relativamente altos de expresión obtenidos, amplio rango de hospedadores y gran capacidad para portar ADN. *Vaccinia* contiene un genoma de ADN bicatenario, lineal, de aproximadamente 186 kb que muestra una preferencia por "A-T" notable. Repeticiones terminales invertidas de aproximadamente 10,5 kb flanquean el genoma. La mayoría de genes esenciales parecen mapearse dentro de la región central, que es la más altamente conservada entre poxvirus. Las fases abiertas de lectura estimadas en virus *vaccinia* suman de 150 a 200. Aunque ambas cadenas son codificantes, no es común un solapamiento extensivo de fases de lectura.

Al menos 25 kb pueden insertarse en el genoma de virus *vaccinia* (Smith y Moss, 1983). Los vectores *vaccinia* prototípicos contienen transgenes insertados en el gen de la timidina quinasa viral mediante recombinación homóloga. Los vectores se seleccionan basándose en un fenotipo de tk. Con la inclusión de la secuencia líder no traducida de virus de encefalomiocarditis, el nivel de expresión es mayor que el de vectores convencionales, acumulándose los transgenes a 10 % o más de la proteína de la célula infectada en 24 h (Elroy-Stein *et al.*, 1989).

Un ácido nucleico para suministrar puede alojarse dentro de un virus infeccioso que se ha modificado técnicamente para expresar un ligando de unión específico. La partícula de virus se unirá por lo tanto específicamente con los receptores afines de la célula diana y suministrará los contenidos a la célula. Un nuevo enfoque diseñado para permitir la dirección específica de vectores retrovirales se desarrolló basándose en la modificación química de un retrovirus por la adición química de restos de lactosa a la envoltura viral. Esta modificación puede permitir la infección específica de hepatocitos mediante receptores de sialoglucoproteína.

Se diseñó otro enfoque para la dirección de retrovirus recombinantes en el que se usaron anticuerpos biotinilados contra una proteína de envoltura retroviral y contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron mediante los componentes de biotina usando estreptavidina (Roux *et al.*, 1989). Usando anticuerpos contra los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y clase II, se demostró la infección de una diversidad de células humanas que portaban los antígenos en superficie con un virus ecotrópico *in vitro* (Roux *et al.*, 1989).

#### b. Suministro no viral

Las formulaciones no virales basadas en lípidos proporcionan una alternativa a las terapias génicas virales. Aunque muchos estudios de cultivo celular han documentado transferencia génica no viral basada en lípidos, el suministro génico sistémico mediante formulaciones basadas en lípidos se ha eliminado. Una limitación importante de suministro génico basado en lípidos no viral es la toxicidad de los lípidos catiónicos que comprenden el vehículo de suministro no viral. La toxicidad *in vivo* de liposomas explica parcialmente la discrepancia entre los resultados de transferencia génica *in vitro* e *in vivo*. Otro factor que contribuye a estos datos contradictorios es la diferencia en la estabilidad de liposomas en presencia y ausencia de proteínas de suero. La interacción entre liposomas y proteínas de suero tiene una influencia drástica en las características de estabilidad de liposomas (Yang y Huang, 1997). Los liposomas catiónicos atraen y se unen con proteínas de suero con carga negativa. Los liposomas recubiertos por proteínas de suero se disuelven o se captan por macrófagos lo que conduce a su retirada de la circulación. Los métodos de suministro liposómico *in vivo* actuales usan aerosolización, inyección subcutánea, intradérmica, intratumoral o intracraneal para evitar la toxicidad y problemas de estabilidad asociados con lípidos catiónicos en circulación. La interacción de liposomas y proteínas de plasma es en gran medida responsable de la disparidad entre la eficacia de transferencia génica *in vitro* (Feigner *et al.*, 1987) e *in vivo* (Zhu *et al.*, 1993; Philip *et al.*, 1993; Solodin *et al.*, 1995; Thierry *et al.*, 1995; Tsukamoto *et al.*, 1995; Aksentijevich *et al.*, 1996).

Avances recientes en las formulaciones de liposomas han mejorado la eficacia de la transferencia génica *in vivo* (Templeton *et al.* 1997; documento WO 98/07408). Una formulación liposómica nueva compuesta de una relación equimolar de 1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetil amonio)propano (DOTAP) y colesterol potencia significativamente la transferencia génica *in vivo* sistémica, aproximadamente 150 veces. Se dice que la formulación lipídica de DOTAP:colesterol forma una estructura única denominada un "liposoma de intercalación". Se ha indicado que esta formulación "intercala" ADN entre una bicapa invaginada o estructura en "jarrón". Las características beneficiosas de estos liposomas incluyen una carga de positiva a negativa o  $p$ , estabilización coloidal por colesterol, empaquetamiento de ADN bidimensional y estabilidad en suero aumentada.

La producción de formulaciones lipídicas se consigue con frecuencia por sonicación o extrusión en serie de mezclas liposómicas después de (I) evaporación de fase inversa, (II) deshidratación-rehidratación, (III) diálisis en detergente y (IV) hidratación en película fina. Una vez fabricadas, las estructuras lipídicas pueden usarse para encapsular compuestos que son tóxicos (quimioterapéuticos) o lábiles (ácidos nucleicos) cuando están en circulación. La encapsulación liposómica ha dado como resultado una menor toxicidad y una mayor semivida en suero para dichos compuestos (Gabizon *et al.*, 1990). Numerosos tratamientos de enfermedad usan estrategias de transferencia génica basadas en lípidos para potenciar terapias convencionales o establecer nuevas terapias, en particular terapias para tratar enfermedades hiperproliferativas.

Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una bicapa lipídica y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando se suspenden lípidos en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos experimentan autorreordenación antes de la formación de estructuras que inmovilizan agua y disuelven solutos entre las bicapas

lipídicas (Ghosh y Bachhawat, 1991). Las moléculas lipófilas o moléculas con reacciones lipófilas también pueden disolverse en o asociarse con la bicapa lipídica.

5 Los liposomas son capaces de portar ácidos nucleicos biológicamente activos, de modo que los ácidos nucleicos estén completamente secuestrados. El liposoma puede contener uno o más ácidos nucleicos y se administra a un hospedador mamífero para suministrar eficazmente sus contenidos a una célula diana. Los liposomas pueden comprender DOTAP y colesterol o un derivado de colesterol.

10 Como se desvela en el presente documento, la relación de DOTAP con respecto a colesterol, derivado de colesterol o mezcla de colesterol puede ser de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, de aproximadamente 9:1 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 8:1 a aproximadamente 1:8, de aproximadamente 7:1 a aproximadamente 1:7, de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 1:6, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:5, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4, de aproximadamente 3:1 a 1:3, de 2:1 a 1:2 y 1:1. Las concentraciones de DOTAP y/o colesterol pueden ser de aproximadamente 1 mM, 2 mM, 3 mM, 15 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 25 mM o 30 mM. La concentración de DOTAP y/o colesterol puede ser entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 20 mM, de 1 mM a aproximadamente 18 mM, de 1 mM a aproximadamente 16 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 14 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 12 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, de 1 a 8 mM, de 2 a 7 mM, de 3 a 6 mM y de 4 a 5 mM. El 20 colesterol puede sustituirse fácilmente por derivados de colesterol o estos pueden mezclarse con el colesterol en el contexto de la presente divulgación. Los expertos en la materia conocen muchos derivados de colesterol. Los ejemplos incluyen pero sin limitación acetato de colesterol y oleato de colesterol. Una mezcla de colesterol se refiere a una composición que contiene al menos un colesterol o derivado de colesterol.

25 La formulación también puede extrairse usando una membrana o un filtro, y esto puede realizarse múltiples veces. Los expertos en la materia conocen dichas técnicas, por ejemplo, en Martin (1990). La extrusión puede realizarse para homogeneizar la formulación o limitar su tamaño. Un método contemplado para preparar liposomas es calentamiento, sonicación y extrusión secuencial de los lípidos a través de filtros de tamaño de poro decreciente, dando como resultado de este modo la formación de estructuras liposómicas estables, pequeñas. Esta preparación 30 produce complejos liposómicos o liposomas solamente de tamaño apropiado y uniforme, que son estructuralmente estables y producen actividad máxima.

Por ejemplo, se desvela que pueden prepararse liposomas de DOTAP:colesterol mediante los métodos de Templeton *et al.* (1997).

35 Por lo tanto, en una realización, DOTAP (lípido catiónico) se mezcla con colesterol (lípido neutro) a concentraciones equimolares. Esta mezcla de lípidos en polvo se disuelve después con cloroformo, la solución se seca hasta una película fina y la película se hidrata en agua que contiene dextrosa 5 % (p/v) para proporcionar una concentración final de DOTAP 20 mM y colesterol 20 mM. La película lipídica hidratada se rota en un baño de agua a 50 °C 40 durante 45 minutos, después a 35 °C durante 10 minutos adicionales y se deja reposar a temperatura ambiente durante una noche. Al día siguiente la mezcla se somete a ultrasonido durante 5 minutos a 50 °C. La mezcla sometida a ultrasonido se transfiere a un tubo y se calienta durante 10 minutos a 50 °C. Esta mezcla se extruye secuencialmente a través de filtros de jeringa de tamaño de poro decreciente (1 µm, 0,45 µm, 0,2 µm, 0,1 µm).

45 También se contempla que pueden combinarse otras formulaciones de liposomas y métodos de preparación para transmitir características de liposomas de DOTAP:colesterol deseadas. Se describen métodos alternativos para preparar formulaciones basadas en lípidos para suministro de ácido nucleico en Saravolac *et al.* (documento WO 99/18933). Se detallan métodos en los que las composiciones lipídicas se formulan específicamente para encapsular ácidos nucleicos. En otra formulación liposómica, un vehículo anfipático denominado un microvehículo de dilución en 50 disolvente (SDMC) permite la integración de moléculas particulares en la bicapa del vehículo lipídico (patente de Estados Unidos 5.879.703). Los SDMC pueden usarse para suministrar lipopolisacáridos, polipéptidos, ácidos nucleicos y similares. Por supuesto, puede usarse cualquier otro método de preparación de liposomas por el experto en la materia para obtener una formulación liposómica deseada como se desvela en el presente documento.

55 También pueden utilizarse en el contexto de la presente divulgación otras formulaciones para suministrar genes a tumores conocidos por los expertos en la materia.

También se desvelan formulaciones liposómicas de nanopartículas para suministro tópico de una construcción de expresión de ácido nucleico. Por ejemplo, la formulación liposómica puede comprender DOTAP y colesterol. Un 60 ejemplo de dicha formulación que contiene una construcción de expresión de ácido nucleico se muestra a continuación.

Pueden mezclarse lípidos catiónicos de (DOTAP) con el colesterol lipídico neutro (col) a concentraciones equimolares (lípidos Avanti). Los lípidos en polvo mezclados pueden disolverse en cloroformo de uso en HPLC 65 (Mallinckrodt, Chesterfield, Mo.) en un matraz de fondo redondo de 1 l. Después de la disolución, la solución puede rotarse en un evaporador rotatorio Buchi a 30 °C durante 30 min para preparar una película fina. El matraz que

contiene la película lipídica fina puede después secarse al vacío durante 15 min. Una vez que se ha completado el secado, la película puede hidratarse en dextrosa al 5 % en agua (D5W) para proporcionar una concentración final de DOTAP 20 mM y colesterol 20 mM, denominada DOTAP:Col 20 mM. La película lipídica hidratada puede rotarse en un baño de agua a 50 °C durante 45 min y después a 35 °C durante 10 min. Después puede permitirse que la mezcla repose en el matraz cubierto con parafilm a temperatura ambiente durante una noche, seguido de ultrasonidos a baja frecuencia (Lab-Line, TranSonic 820/H) durante 5 min a 50 °C. Después de los ultrasonidos, la mezcla puede transferirse a un tubo y calentarse durante 10 min a 50 °C, seguido de extrusión secuencial mediante filtros Whatman (Kent, Reino Unido) de tamaño decreciente: 1,0, 0,45, 0,2 y 0,1 µm usando jeringas. Pueden usarse filtros Whatman Anotop, de 0,2 µm y 0,1 µm. Después de la extrusión, los liposomas pueden almacenarse con gas argón a 4 °C.

Una construcción de expresión de ácido nucleico en forma de ADN plasmídico, por ejemplo 150 µg, puede diluirse en D5W. Los liposomas almacenados también pueden diluirse en una solución separada de D5W. Después pueden mezclarse volúmenes iguales de la solución de ADN como de la solución liposómica para proporcionar una concentración final de, por ejemplo, 150 µg de ADN/300 µl de volumen (2,5 µg/5 µl). Puede realizarse dilución y mezclado a temperatura ambiente. La solución de ADN puede después añadirse rápidamente en la superficie de la solución liposómica usando una punta de pipeta Pipetman. La mezcla de ADN:liposoma puede después mezclarse rápidamente arriba y abajo dos veces en la punta de pipeta para formar complejos de construcción de expresión de ácido nucleico de DOTAP:colesterol.

Usando las enseñanzas de la memoria descriptiva y el conocimiento de los expertos en la materia, se pueden realizar ensayos para determinar el tamaño de partículas del complejo de expresión de ácido nucleico-DOTAP:Col. Por ejemplo, el tamaño de partícula del complejo de construcción de expresión de ácido nucleico-DOTAP:Col puede determinarse usando el analizador de tamaño de partículas N4-Coulter (Beckman-Coulter). Para esta determinación, deberían diluirse 5 µl del complejo recién preparado en 1 ml de agua antes de la determinación del tamaño de partícula. Adicionalmente, puede emplearse también una lectura espectrofotométrica del complejo a D.O. 400 nm en análisis. Para este análisis, pueden diluirse 5 µl de la muestra en 95 µl de D5W para preparar un volumen final de 100 µl. La aplicación de las técnicas de formulación anteriores con los métodos de análisis de tamaño deberían demostrar un tamaño del complejo entre 374 y 400 nm.

Las nanocápsulas pueden en general inmovilizar compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debidos a sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (tamaño de aproximadamente 0,1 µm) deberían diseñarse usando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Se contemplan nanopartículas de polialquilo-cianoacrilato biodegradables que cumplen estos requisitos para su uso en la presente invención, y dichas partículas pueden prepararse fácilmente. Los métodos que conciernen al uso de nanopartículas que pueden usarse con los métodos y composiciones desvelados en el presente documento incluyen patente de Estados Unidos 6.555.376, patente de Estados Unidos 6.797.704, solicitud de patente de Estados Unidos 20050143336, solicitud de patente de Estados Unidos 20050196343 y solicitud de patente de Estados Unidos 20050260276.

La publicación de patente de Estados Unidos 20050143336, por ejemplo, proporciona ejemplos de formulaciones de nanopartículas que contienen genes supresores de tumores tales como p53 y FUS-1 en forma de ácido nucleico que están en complejo con lípidos catiónicos tales como DOTAP o lípidos neutros tales como DOPE que forman liposomas.

## 2. Suministro de vector y transformación de células

Se cree que los métodos adecuados para suministro de ácido nucleico para transformación de un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo para uso en el contexto de la presente divulgación incluyen prácticamente cualquier método por el que pueda introducirse un ácido nucleico (por ejemplo, ADN) en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o como conocería un experto habitual en la materia. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, suministro directo de ADN tal como mediante transfección *ex vivo* (Wilson *et al.*, 1989; Nabel *et al.*, 1989), mediante inyección (patentes de Estados Unidos 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859), incluyendo microinyección (Harland y Weintraub, 1985; patente de Estados Unidos 5.789.215); por electroporación (patente de Estados Unidos 5.384.253; Tur-Kaspa *et al.*, 1986; Potter *et al.*, 1984); mediante precipitación con fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); usando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, 1985); mediante carga sónica directa (Fechheimer *et al.*, 1987); mediante transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1980; Kaneda *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1991) y transfección mediada por receptor (Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988); mediante bombardeo con microproyectiles (documentos WO 94/09699 y WO 95/06128; patentes de Estados Unidos 5.610.042; 5.322.783, 5.563.055, 5.550.318, 5.538.877 y 5.538.880); mediante agitación con fibras de carburo de silicio (Kaepler *et al.*, 1990; patentes de Estados Unidos 5.302.523 y 5.464.765); y cualquier combinación de dichos métodos.

### 3. Sistemas de expresión

Existen numerosos sistemas de expresión que comprenden al menos una parte de o todas las composiciones analizadas anteriormente. Pueden emplearse sistemas basados en procariontes y/o eucariotes para uso en el contexto de la presente divulgación para producir secuencias de ácido nucleico, o sus polipéptidos, proteínas y péptidos afines. Muchos de dichos sistemas están disponibles en el mercado y ampliamente.

El sistema de célula de insecto/baculovirus puede producir un alto nivel de expresión de proteínas de un segmento de ácido nucleico heterólogo, tal como se describe en las patentes de Estados Unidos 5.871.986, 4.879.236 y que puede obtenerse, por ejemplo, con el nombre MAXBAC<sup>®</sup> 2.0 de INVITROGEN<sup>®</sup> y sistema de expresión de baculovirus BACPACK<sup>™</sup> de CLONTECH<sup>®</sup>.

Otros ejemplos de sistemas de expresión incluyen el sistema de expresión de mamíferos inducible COMPLETE CONTROL<sup>™</sup> de STRATAGENE<sup>®</sup>, que implica un receptor inducible por ecdisoma sintético, o su sistema de expresión pET, un sistema de expresión de *E. coli*. Otro ejemplo de un sistema de expresión inducible está disponible de INVITROGEN<sup>®</sup>, que porta el sistema T-REX<sup>™</sup> (expresión regulada por tetraciclina), un sistema de expresión de mamíferos inducible que usa el promotor de CMV de longitud completa. INVITROGEN<sup>®</sup> también proporciona un sistema de expresión de levadura denominado el sistema de expresión de *Pichia methanolica*, que se diseña para producción de alto nivel de proteínas recombinantes en la levadura metilotrófica *Pichia methanolica*. Un experto en la materia conocerá cómo expresar un vector, tal como una construcción de expresión, para producir una secuencia de ácido nucleico o su polipéptido, proteína o péptido afín.

Se contempla que el gen terapéutico puede estar "sobrexpresado", es decir, expresarse a niveles aumentados en relación con su expresión natural en células. Dicha sobreexpresión puede evaluarse por una diversidad de métodos, incluyendo radiomarcaje y/o purificación de proteínas. Sin embargo, se contemplan métodos sencillos y directos, por ejemplo, los que implican SDS/PAGE y tinción de proteínas o transferencia de western, seguido de análisis cuantitativos, tales como exploración densitométrica del gen o la transferencia resultantes. Un aumento específico en el nivel de la proteína, el polipéptido o el péptido recombinante en comparación con el nivel en células naturales es indicativo de sobreexpresión, como lo es una abundancia relativa de la proteína, los polipéptidos o los péptidos específicos en relación con las otras proteínas producidas por la célula hospedadora, por ejemplo, visibles en un gel.

Como se desvela en el presente documento, la secuencia proteica expresada forma un cuerpo de inclusión en la célula hospedadora, las células hospedadoras se lisan, por ejemplo, por rotura en un homogeneizador celular, se lavan y/o se centrifugan para separar los cuerpos de inclusión densos y membranas celulares de los componentes celulares solubles. Esta centrifugación se puede realizar en condiciones por las que los cuerpos de inclusión densos se enriquecen selectivamente por una incorporación de azúcares, tales como sacarosa, en el tampón y centrifugación a una velocidad selectiva. Los cuerpos de inclusión pueden solubilizarse en soluciones que contienen altas concentraciones de urea (por ejemplo, 8 M) o agentes caotrópicos tales como clorhidrato de guanidina en presencia de agentes reductores, tales como  $\beta$ -mercaptoetanol o DTT (ditiotretol), y se repliegan en una conformación más deseable, como conocería un experto habitual en la materia.

Las secuencias de nucleótidos y proteínas para agentes terapéuticos se han desvelado previamente, y pueden encontrarse en bases de datos computarizadas conocidas por los expertos habituales en la materia. Una de dichas bases de datos es la base de datos de Genbank y GenPept del centro nacional para la información biotecnológica ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Las regiones codificantes para estos genes conocidos pueden amplificarse y/o expresarse usando las técnicas desveladas en el presente documento o por cualquier técnica que conozcan los expertos habituales en la materia. Adicionalmente, pueden sintetizarse secuencias peptídicas por métodos conocidos por los expertos habituales en la materia, tales como síntesis peptídica usando máquinas de síntesis peptídica automáticas, tales como las disponibles de Applied Biosystems (Foster City, CA).

### IV. Terapias tumorales de combinación

De acuerdo con ciertos aspectos de la presente divulgación, se pueden aplicar una o más terapias con beneficio de combinación a los pacientes. Dichas terapias incluyen radiación, quimioterapia, cirugía, citocinas, inmunoterapia, terapias biológicas, toxinas, fármacos, dieta o una terapia génica. Se analizan ejemplos posteriormente.

Para destruir células cancerosas, ralentizar su crecimiento o conseguir cualquiera de los criterios de valoración clínicos analizados anteriormente, se puede poner en contacto la célula cancerosa o el tumor con terapia génica de p53 primaria en combinación con una terapia antineoplásica secundaria. Estas dos modalidades se proporcionan en una cantidad combinada eficaz para destruir o inhibir la proliferación de la célula cancerosa, o para conseguir el criterio de valoración clínico deseado, incluyendo aumento de la supervivencia del paciente. Este proceso puede implicar poner en contacto la célula cancerosa o el tumor con ambas modalidades al mismo tiempo. Esto puede conseguirse poniendo en contacto la célula cancerosa o el tumor con una única composición o formulación farmacológica que incluye ambos agentes, o poniendo en contacto la célula cancerosa o el tumor con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en las que una composición incluye la terapia génica primaria y la otra incluye la segunda terapia.

Como alternativa, la terapia génica de p53 primaria puede preceder o seguir a la segunda terapia con intervalos que varían de minutos a semanas. Cuando las dos modalidades se aplican por separado a la célula cancerosa o el tumor, en general se aseguraría que no se supere un periodo de tiempo significativo entre el tiempo de cada suministro, de modo que ambos aún podrían ejercer un efecto combinado de forma ventajosa en la célula cancerosa o el tumor. En dichos casos, se contempla que se pondría en contacto la célula con ambas modalidades en un periodo de aproximadamente 12-24 horas entre sí y, más particularmente, en un periodo de aproximadamente 6-12 horas entre sí, siendo más particular un tiempo de retardo de solamente aproximadamente 12 horas. En algunas situaciones, puede ser deseable extender el periodo de tiempo para tratamiento significativamente, sin embargo, cuando transcurren de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las administraciones respectivas.

También es concebible que se desee más de una administración de cada modalidad. Pueden emplearse diversas combinaciones, en las que la terapia génica primaria es "A" y la terapia secundaria es "B":

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

### A. Ácidos nucleicos terapéuticos que codifican genes terapéuticos

Como se ha analizado anteriormente, en el contexto de la presente divulgación, puede existir la necesidad de proporcionar a un paciente un gen terapéutico con el fin de tratar una enfermedad hiperproliferativa. La expresión "terapia génica" dentro de esta solicitud puede definirse como suministro de un gen terapéutico u otro ácido nucleico terapéutico a un paciente que lo necesite para el fin de tratar una enfermedad hiperproliferativa o para tratar una afección que, si se deja sin tratar puede dar como resultado una enfermedad hiperproliferativa. Esta abarcado dentro de la definición de "gen terapéutico" un gen terapéutico "biológicamente funcional equivalente". En consecuencia, secuencias que tienen de aproximadamente 70 % a aproximadamente 99 % de homología de aminoácidos que son idénticos o funcionalmente equivalentes a los aminoácidos del gen terapéutico serán secuencias que son equivalentes biológicamente funcionales siempre que se mantenga la actividad biológica de la proteína. Las clases de genes terapéuticos incluyen genes supresores de tumores, reguladores del ciclo celular, genes proapoptóticos, citocinas, toxinas, factores antiangiogénicos y moléculas que inhiben oncogenes, factores proangiogénicos, factores de crecimiento, transcritos antisentido, ribozimas y ARNi.

Los ejemplos de genes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, Rb, CFTR, p16, p21, p27, p57, p73, C-CAM, APC, CTS-1, zac, scFV *ras*, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, BRCA1, VHL, MMAC1, FCC, MCC, BRCA2, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, GM-CSF, G-CSF, timidina quinasa, mda7, fus, interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$ , interferón  $\gamma$ , ADP, p53, ABLI, BLC1, BLC6, CBFA1, CBL, CSFIR, ERBA, ERBB, EBRB2, ETS1, ETS2, ETV6, FGR, FOX, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MDM2, MLL, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM1, PML, RET, SRC, TAL1, TCL3, YES, MADH4, RB1, TP53, WT1, TNF, BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, ApoA1, ApoAIV, ApoE, Rap1A, citosina desaminasa, Fab, ScFv, BRCA2, zac1, ATM, HIC-1, DPC-4, FHIT, PTEN, ING1, NOEY1, NOEY2, OVCA1, MADR2, 53BP2, IRF-1, Rb, zac1, DBCCR-1, rks-3, COX-1, TFPI, PGS, Dp, E2F, *ras*, *myc*, *neu*, *raf*, *erb*, *fins*, *trk*, *ret*, *gsp*, *hst*, *abl*, E1A, p300, VEGF, FGF, trombospondina, BAI-1, GDAIF o MCC.

Otros ejemplos de genes terapéuticos incluyen genes que codifican enzimas. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, ACP desaturasa, una ACP hidroxilasa, una ADP-glucosa piroforilasa, una ATPasa, un alcohol deshidrogenasa, una amilasa, una amiloglucosidasa, una catalasa, una celulasa, una ciclooxigenasa, una descarboxilasa, una dextrinasa, una esterasa, una ADN polimerasa, una ARN polimerasa, una hialuron sintasa, una galactosidasa, una glucanasa, una glucosa oxidasa, una GTPasa, una helicasa, una hemicelulasa, una hialuronidasa, una integrasa, una invertasa, una isomerasa, una quinasa, una lactasa, una lipasa, una lipoxigenasa, una liasa, una lisozima, una pectinesterasa, una peroxidasa, una fosfatasa, una fosfolipasa, una fosforilasa, una poligalacturonasa, una proteinasa, una peptidasa, una pulanasa, una recombinasa, una transcriptasa inversa, una topoisomerasa, una xilanas, un gen indicador, una interleucina o una citocina.

Los ejemplos adicionales de genes terapéuticos incluyen el gen que codifica carbamoil sintetasa I, ornitina transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato liasa, arginasa, fumarilacetacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, receptor de lipoproteínas de baja densidad, porfobilinógeno desaminasa, factor VIII, factor IX, cistación  $\beta$ -sintasa, cetoácido de cadena ramificada descarboxilasa, albúmina, isovaleril-CoA deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, metil malonil CoA mutasa, glutaril CoA deshidrogenasa, insulina,  $\beta$ -glucosidasa, piruvato carboxilasa, fosforilasa hepática, fosforilasa quinasa, glicina descarboxilasa, proteína H, proteína T, ATPasa transportadora de cobre de enfermedad de Menkes, ATPasa transportadora de cobre de enfermedad de Wilson, citosina desaminasa, hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa, galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, fenilalanina hidroxilasa, glucocerebrosidasa, esfingomielinasa,  $\alpha$ -L-iduronidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, timidina quinasa de VHS o timidina quinasa humana.

Los genes terapéuticos también incluyen genes que codifican hormonas. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, genes que codifican hormona del crecimiento, prolactina, lactógeno placentario, hormona luteinizante, hormona estimulante del folículo, gonadotropina coriónica, hormona estimulante del tiroides, leptina, adrenocorticotropina, angiotensina I, angiotensina II,  $\beta$ -endorfina, hormona estimulante de melanocitos  $\beta$ , colecistoquinina, endotelina I, galanina, péptido inhibidor gástrico, glucagón, insulina, lipotropinas, neurofisinas, somatostatina, calcitonina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina  $\beta$ , hipercalcemia de factor de malignidad, proteína relacionada con hormona paratiroidea, proteína relacionada con hormona paratiroidea, péptido de tipo glucagón, pancreastatina, péptido pancreático, péptido YY, PHM, secretina, péptido intestinal vasoactivo, oxitocina, vasopresina, vasotocina, encefalinamida, metorfinamida, hormona estimulante de melanocitos  $\alpha$ , factor natriurético auricular, amilina, componente amiloide P, hormona liberadora de corticotropina, factor liberador de hormona del crecimiento, hormona liberadora de hormona luteinizante, neuropéptido Y, sustancia K, sustancia P u hormona liberadora de tirotrópina.

Otros ejemplos de genes terapéuticos incluyen genes que codifican antígenos presentes en tejidos hiperproliferativos que pueden usarse para inducir una respuesta inmunitaria contra ese tejido. Se conocen bien en la técnica terapias inmunitarias antineoplásicas, por ejemplo, en más detalle en la solicitud de PCT W00333029, W00208436, W00231168 y W00285287.

Otros genes terapéuticos más son los que codifican moléculas inhibitoras, tales como antisentido, ribozimas, ARNip y anticuerpos monocatenarios. Dichas moléculas pueden usarse provechosamente para inhibir genes hiperproliferativos, tales como oncogenes, inductores de la proliferación celular y factores proangiogénicos.

### **I. Ácidos nucleicos que codifican supresores tumorales**

Un "supresor tumoral" se refiere a un polipéptido que, cuando está presente en una célula, reduce la tumorigenicidad, malignidad o fenotipo hiperproliferativo de la célula. Las secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos de genes supresores de tumores incluyen la secuencia de ácido nucleico de longitud completa del gen supresor de tumores, así como secuencias que no son de longitud completa de cualquier longitud derivadas de las secuencias de longitud completa. Se entiende además que la secuencia incluye los codones degradados de la secuencia o las secuencias nativas que pueden introducirse para proporcionar preferencia codónica en una célula hospedadora específica.

En general, en el presente documento se define que los "genes supresores de tumores" se refieren a secuencias de ácido nucleico que reducen la tumorigenicidad, la malignidad o el fenotipo hiperproliferativo de la célula. Por lo tanto, la ausencia, mutación o alteración de la expresión normal de un gen supresor de tumores en una célula, en lo demás sana, aumenta la probabilidad de, o da como resultado, la obtención por la célula de un estado neoplásico. Por el contrario, cuando en una célula están presentes un gen o una proteína supresora de tumores funcional, su presencia suprime la tumorigenicidad, la malignidad o el fenotipo hiperproliferativo de la célula hospedadora. Los ejemplos de ácidos nucleicos supresores de tumores dentro de esta definición, incluyen, pero sin limitación, APC, CYLD, HIN-1, KRAS2b, p16, p19, p21, p27, p27mt, p53, p57, p73, PTEN, Rb, uteroglobina, Skp2, BRCA-1, BRCA-2, CHK2, CDKN2A, DCC, DPC4, MADR2/JV18, FHIT, MEN1, MEN2, MTS1, NF1, NF2, VHL, WRN, WT1, CFTR, C-CAM, CTS-1, zac1, scFV, *ras*, MMAC1, FCC, MCC, gen 26 (CACNA2D2), PL6, Beta\* (BLU), Luca-1 (HYAL1), Luca-2 (HYAL2), 123F2 (RASSF1), 101F6, gen 21 (NPRL2), o un gen que codifica un polipéptido SEM A3 y FUS1. Se describen otros genes supresores de tumores ejemplares en una base de datos de genes supresores de tumores en (la web [cise.ufl.edu/~yyl/HTML-TSGDB/Homepage.html](http://cise.ufl.edu/~yyl/HTML-TSGDB/Homepage.html)).

Los ácidos nucleicos que codifican genes supresores de tumores, como se ha analizado anteriormente, incluyen genes supresores de tumores, o ácidos nucleicos derivados de los mismos (por ejemplo, ADNc, ARNc, ARNm y subsecuencias de los mismos que codifican fragmentos activos de las secuencias de aminoácidos supresoras de tumores respectivas), así como vectores que comprende estas secuencias. Un experto habitual en la materia estará familiarizado con genes supresores de tumores que pueden aplicarse en la presente invención.

### **2. Ácidos nucleicos que codifican anticuerpos monocatenarios**

Como se desvela en el presente documento, el ácido nucleico de las composiciones farmacéuticas y dispositivos expuestos en el presente documento codifica un anticuerpo monocatenario. Se describen anticuerpos monocatenarios en las patentes de Estados Unidos 4.946.778 y 5.888.773.

### **3. Ácidos nucleicos que codifican citocinas**

El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Una "secuencia de aminoácidos de citocina" se refiere a un polipéptido que, cuando está presente en una célula, mantiene parte de o toda la función de una citocina. Las secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias de aminoácidos de citocinas incluyen tanto la secuencia de ácido nucleico de longitud completa de la citocina, como secuencias de longitud incompleta de cualquier longitud derivadas de la secuencia de longitud completa. Se entiende además que, como se ha analizado anteriormente, la secuencia incluye

los codones degradados de la secuencia o las secuencias nativas que pueden introducirse para proporcionar preferencia codónica en una célula hospedadora específica.

5 Son ejemplos de dichas citocinas linfocinas, monocinas, factores de crecimiento y hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citocinas hormonas del crecimiento tales como hormona del crecimiento humana, hormona del crecimiento humana N-metionilo, y hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glucoproteicas tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario, proteína OB; factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ ; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado con gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factor de crecimiento de tipo insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); 10 CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-24 (MDA-7), LIF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EPO, ligando de kit o FLT-3.

#### 20 4. Ácidos nucleicos que codifican genes proapoptóticos/reguladores de la muerte celular programada

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso esencial para el desarrollo embrionario normal, mantenimiento de la homeostasis en tejidos adultos y supresión de carcinogénesis (Kerr *et al.*, 1972). La familia de Bcl-2 de proteínas y proteasas de tipo ICE han demostrado ser importantes reguladores y efectores de la apoptosis en otros sistemas. La proteína Bcl-2, descubierta en asociación con el linfoma folicular, desempeña un papel 25 prominente en el control de la apoptosis y potenciación de la supervivencia celular en respuesta a diversos estímulos apoptóticos (Bakhshi *et al.*, 1985; Cleary y Sklar, 1985; Cleary *et al.*, 1986; Tsujimoto *et al.*, 1985; Tsujimoto y Croce, 1986). Se reconoce ahora que la proteína Bcl-2 conservada evolutivamente es un miembro de una familia de proteínas relacionadas, que pueden clasificarse como agonistas de muerte o antagonistas de muerte.

30 Después de este descubrimiento, se ha mostrado que Bcl-2 actúa para suprimir muerte celular desencadenada por una diversidad de estímulos. Además, resulta ahora evidente que hay una familia de proteínas reguladoras de muerte celular Bcl-2 que comparten homologías de secuencia y estructurales comunes. Se ha mostrado que estos diferentes miembros de la familia poseen funciones similares a Bcl-2 (por ejemplo, Bcl<sub>XL</sub>, Bcl<sub>L</sub>, Bcl<sub>S</sub>, Mcl-1, Al, Bfl-1) o contrarrestan la función de Bcl-2 y promueven la muerte celular. Estos últimos, conocidos como genes proapoptóticos, codifican proteínas que inducen o mantienen la apoptosis hasta una forma activa. La presente 35 invención contempla la inclusión de cualquier secuencia de aminoácidos de gen proapoptótico conocida por los expertos habituales en la materia. Los genes proapoptóticos ejemplares incluyen CD95, caspasa-3, Bax, Bag-1, CRADD, TSSC3, bax, hid, Bak, MKP-7, PERP, bad, bcl-2, MST1, bbc3, Sax, BIK, BID y mda7. Un experto habitual en la materia estaría familiarizado con genes proapoptóticos, y otros de dichos genes no expuestos específicamente en el presente documento que puedan aplicarse en los métodos y composiciones de la presente invención.

Los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos de genes proapoptóticos incluyen genes proapoptóticos o ácidos nucleicos derivados de los mismos (por ejemplo, ADNc, ARNm y subsecuencias de los mismos que codifican fragmentos activos de la secuencia de aminoácidos proapoptótica respectiva), así como 45 vectores que comprenden estas secuencias. Una "secuencia de aminoácidos de gen proapoptótico" se refiere a un polipéptido que, cuando está presente en una célula, induce o promueve la apoptosis.

#### 50 5. Ácidos nucleicos que codifican inhibidores de angiogénesis

Los inhibidores de angiogénesis incluyen angiostatina y endostatina. La angiostatina es un polipéptido de aproximadamente 200 aminoácidos. Se produce por la escisión de plasminógeno, una proteína de plasma que es importante para disolver coágulos sanguíneos. La angiostatina se une con subunidades de ATP sintasa expuestas en la superficie de la célula incluida en la membrana plasmática. Antes de este descubrimiento reciente, la ATP sintasa se conocía solamente como una proteína mitocondrial. La endostatina es un polipéptido de 184 aminoácidos. 55 Es el dominio globular hallado en el extremo C terminal de colágeno de tipo XVIII (Mulder *et al.*, 1995), un colágeno hallado en vasos sanguíneos, cortado de la molécula parental.

Los inhibidores de angiogénesis también incluyen inhibidores o factores proangiogénicos, tales como antisentido, ribozimas, ARNip y anticuerpos monocatenarios, que se describen en otra parte del presente documento. Las 60 células epiteliales expresan proteínas transmembrana en su superficie, denominadas integrinas, por las que se anclan a la matriz extracelular. Resulta que los nuevos vasos sanguíneos en tumores expresan una integrina vascular, designada  $\alpha v/\beta 3$ , que no se encuentra en los vasos sanguíneos viejos de tejidos normales. Vitaxin®, un anticuerpo monoclonal dirigido contra la integrina vascular  $\alpha v/\beta 3$ , encoge tumores en ratones sin perjudicarlos. En ensayos clínicos de fase II en seres humanos, se ha mostrado que Vitaxin® es prometedor en el encogimiento de 65 tumores sólidos sin efectos secundarios perjudiciales.

**6. Ácidos nucleicos que codifican inductores de proliferación celular**

5 Las proteínas que inducen proliferación celular quedan además en diversas categorías dependientes de la función. La coincidencia de todas estas proteínas es su capacidad para regular la proliferación celular. Por ejemplo, una forma de PDGF, el oncogén sis, es un factor de crecimiento secretado. Los oncogenes no suelen surgir de genes que codifican factores de crecimiento, y en la actualidad, sis es el único factor de crecimiento oncogénico de origen natural conocido.

10 Las proteínas FMS, ErbA, ErbB y neu son receptores de factores de crecimiento. Las mutaciones de estos receptores dan como resultado pérdida de función regulable. Por ejemplo, una mutación puntual que afecta al dominio transmembrana de la proteína receptora de Neu da como resultado el oncogén Neu. El oncogén erbA deriva del receptor intracelular para hormona tiroidea. Se cree que el receptor de ErbA oncogénico modificado compite con el receptor de hormona tiroidea endógeno, provocando un crecimiento descontrolado.

15 La mayor clase de oncogenes incluye las proteínas transductoras de señal (por ejemplo, Src, Abl y Ras). La proteína Src es una proteína tirosina quinasa citoplasmática, y su transformación de protooncogén a oncogén en algunos casos, resulta de mutaciones en el resto de tirosina 527. Por el contrario, la transformación de la proteína GTPasa ras de protooncogén a oncogén, en un ejemplo resulta de una mutación de valina a glicina en el aminoácido 12 en la secuencia, reduciendo la actividad GTPasa de ras.

20 Las proteínas Jun, Fos y Myc son proteínas que ejercen directamente sus efectos en funciones nucleares como factores de transcripción.

25 La metodología antisentido aprovecha el hecho de que los ácidos nucleicos tienden a emparejarse con secuencias "complementarias". Por complementarias, se entiende que los polinucleótidos son los capaces de formar pares de bases de acuerdo con las reglas de complementariedad de Watson-Crick convencionales. Es decir, las purinas mayores formarán pares de bases con las pirimidinas menores para formar combinaciones de guanina emparejada con citosina (G:C) y adenina emparejada con timina (A:T) en el caso de ADN, o adenina emparejada con uracilo (A:U) en el caso de ARN. La inclusión de bases menos comunes tales como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras en secuencias de hibridación no interfiere con el emparejamiento.

35 La dirección de ADN bicatenario (bc) con polinucleótidos conduce a formación de triple hélice; la dirección a ARN conducirá a formación de doble hélice. Los polinucleótidos antisentido, cuando se introducen en una célula diana, se unen específicamente a su polinucleótido diana e interfieren con la transcripción, el procesamiento de ARN, el transporte, la traducción y/o la estabilidad. Pueden emplearse construcciones de ARN antisentido, o ADN que codifica dicho ARN antisentido, para inhibir la transcripción o traducción génica o ambas dentro de una célula hospedadora, bien *in vitro* o bien *in vivo*, tal como dentro de un animal hospedador, incluyendo un sujeto humano. Se desvela en el presente documento que las terapias de ARNip, ribozimas y anticuerpos monocatenarios dirigidas a inductores particulares de proliferación celular pueden usarse para prevenir la expresión del inductor de proliferación celular, y de este modo proporcionar un beneficio clínico a un paciente con cáncer.

**7. Terapias basadas en ácidos nucleicos adicionales**

45 Pueden diseñarse construcciones antisentido para unirse con el promotor y otras regiones de control, exones, intrones o incluso límites de exón-intrón de un gen. Se contempla que las construcciones antisentido más eficaces incluirán regiones complementarias de puntos de unión de corte y empalme de intrón/exón. Por lo tanto, se desvela que se incluye una construcción antisentido con complementariedad con regiones en un intervalo de 50-200 bases de un punto de unión de corte y empalme de intrón-exón. Se ha observado que algunas secuencias exónicas pueden incluirse en la construcción sin afectar gravemente a la selectividad diana de la misma. La cantidad de material exónico incluido variará dependiendo de las secuencias exónicas e intrónicas particulares usadas. Se puede ensayar fácilmente si se incluye demasiado ADN exónico simplemente ensayando las construcciones *in vitro* para determinar si la función celular normal está afectada o si la expresión de genes relacionados que tienen secuencias complementarias está afectada.

55 Como se ha indicado anteriormente, "complementarias" o "antisentido" significa secuencias polinucleotídicas que son sustancialmente complementarias sobre su longitud completa y tienen muy pocos desapareamientos de bases. Por ejemplo, las secuencias de quince bases de longitud pueden denominarse complementarias cuando tengan nucleótidos complementarios en trece o catorce posiciones. De forma natural, las secuencias que son completamente complementarias serán secuencias que son totalmente complementarias a lo largo de su longitud completa y no tienen desapareamientos de bases. Otras secuencias con menores grados de homología también se contemplan. Por ejemplo, podría diseñarse una construcción antisentido que tenga regiones limitadas de alta homología, pero que también contenga una región no homóloga (por ejemplo, ribozima; véase posteriormente). Estas moléculas, aunque tienen menos de 50 % de homología, se unirían con secuencias diana en condiciones apropiadas.

65 Puede ser ventajoso combinar partes de ADN genómico con ADNc o secuencias sintéticas para generar

construcciones específicas. Por ejemplo, cuando se desea un intrón en la construcción última, será necesario usar un clon genómico. El ADNc o un polinucleótido sintetizado pueden proporcionar sitios de restricción más convenientes para la parte restante de la construcción y, por lo tanto, se usarían para el resto de la secuencia.

5 Como se desvela en el presente documento, el ácido nucleico de las composiciones farmacéuticas y dispositivos expuestos en el presente documento puede ser una ribozima. Aunque se han usado tradicionalmente proteínas para catálisis de ácidos nucleicos, ha surgido otra clase de macromoléculas como útiles en esta empresa. Las ribozimas son complejos de ARN-proteína que escinden ácidos nucleicos de una manera específica de sitio. Las ribozimas tienen dominios catalíticos específicos que poseen actividad endonucleasa (Kim y Cook, 1987; Gerlach *et al.*, 1987; Forster y Symons, 1987). Por ejemplo, un gran número de ribozimas aceleran las reacciones de transferencia de fosfoéster con un alto grado de especificidad, escindiendo con frecuencia solamente uno de varios fosfoésteres en un sustrato oligonucleotídico (Cook *et al.*, 1981; Michel y Westhof, 1990; Reinhold-Hurek y Shub, 1992). Esta especificidad se ha atribuido al requisito de que el sustrato se una mediante interacciones de formaciones de pares de bases específicas con la secuencia guía interna ("IGS") de la ribozima antes de la reacción química.

15 Se ha observado catálisis por ribozimas principalmente como parte de las reacciones de ligamiento/escisión específicas de secuencia que implican ácidos nucleicos (Joyce, 1989; Cook *et al.*, 1981). Por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.354.855 indica que ciertas ribozimas pueden actuar como endonucleasas con una especificidad de secuencia mayor que la de ribonucleasas conocidas y cercana a la de las enzimas de restricción de ADN. Por lo tanto, la inhibición mediada por ribozimas específica de secuencia de la expresión génica puede ser particularmente adecuada para aplicaciones terapéuticas (Scanlon *et al.*, 1991; Sarver *et al.*, 1990). Recientemente, se ha indicado que las ribozimas indujeron cambios genéticos en algunas líneas celulares a las que se aplicaron; los genes alterados incluyeron los oncogenes H-ras, c-fos y genes de VIH. La mayor parte de este trabajo implicaba la modificación de un ARNm diana, basándose en un codón mutante específico que se escinde por una ribozima específica.

20 Como se desvela en el presente documento, el ácido nucleico terapéutico de las composiciones farmacéuticas expuestas en el presente documento puede ser un ARNi. La interferencia de ARN (también denominada "interferencia mediada por ARN" o ARNi) es un mecanismo por el que la expresión génica puede reducirse o eliminarse. Se ha observado que el ARN bicatenario (ARNbc) media en la reducción, que es un proceso multietapa. El ARNc activa mecanismos de vigilancia de expresión génica postranscripcionales que parecen actuar para defender las células de infección por virus y actividad de transposones (Fire *et al.*, 1998; Grishok *et al.*, 2000; Ketting *et al.*, 1999; Lin y Avery *et al.*, 1999; Montgomery *et al.*, 1998; Sharp y Zamore, 2000; Tabara *et al.*, 1999). La activación de estos mecanismos dirige el ARNm complementario de ARNbc, maduro, para su destrucción. ARNi ofrece ventajas experimentales importantes para el estudio de la función génica. Estas ventajas incluyen una muy alta especificidad, facilidad de movimiento entre membranas celulares y regulación negativa prolongada del gen diana (Fire *et al.*, 1998; Grishok *et al.*, 2000; Ketting *et al.*, 1999; Lin y Avery *et al.*, 1999; Montgomery *et al.*, 1998; Sharp *et al.*, 1999; Sharp y Zamore, 2000; Tabara *et al.*, 1999). Además, se ha mostrado que ARNbc silencia genes en una amplia serie de sistemas, incluyendo plantas, protozoos, hongos, *C. elegans*, *Trypanosoma*, *Drosophila* y mamíferos (Grishok *et al.*, 2000; Shaip *et al.*, 1999; Sharp y Zamore, 2000; Elbashir *et al.*, 2001). Está aceptado en general que el ARNi actúa postranscripcionalmente, dirigiendo transcritos de ARN para degradación. Parece que el ARN tanto nuclear como citoplasmático puede ser diana (Bosher y Labouesse, 2000).

35 Se sabe que la endorribonucleasa Dicer produce dos tipos de ARN reguladores pequeños que regulan la expresión génica: ARN de interferencia pequeños (ARNip) y microARN (miARN) (Bemstein *et al.*, 2001; Grishok *et al.*, 2001; Hutvagner *et al.*, 2001; Ketting *et al.*, 2001; Knight y Bass, 2001). En animales, los ARNip dirigen la escisión del ARNm diana (Elbashir *et al.*, 5 2001), mientras que los miARN bloquean la traducción de ARNm diana (Lee *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2000; Brennecke *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). Los datos recientes sugieren que tanto ARNip como miARN se incorporan en complejos proteicos similares, quizás incluso idénticos, y que un determinante crítico de la destrucción de ARNm frente a la regulación de la traducción es el grado de complementariedad de secuencia entre el ARN pequeño y su ARNm diana (Hutvagner y Zamore, 2002; Mourelatos *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2002; Doench *et al.*, 2003; Saxena *et al.*, 2003; Zeng *et al.*, 2003). Muchas secuencias de miARN conocidas y su posición en genomas o cromosomas pueden encontrarse en [www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/help/summary.shtml](http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/help/summary.shtml).

45 Los ARNip deben diseñarse de modo que sean específicos y eficaces en la supresión de la expresión de los genes de interés. Los métodos de selección de las secuencias diana, es decir, las secuencias presentes en el gen o los genes de interés a los que los ARNip orientarán la maquinaria de degradación, se dirigen para evitar secuencias que puedan interferir con la función de orientación de los ARNip mientras que incluyen secuencias que son específicas para el gen o los genes. Típicamente, las secuencias diana de ARNip de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud son más eficaces. Esta longitud refleja las longitudes de los productos de digestión resultantes del procesamiento de ARN mucho más largos como se ha descrito anteriormente (Montgomery *et al.*, 1998).

50 La preparación de ARNip ha sido principalmente mediante síntesis química directa; mediante procesamiento de ARN bicatenario, más largo, mediante exposición a lisados de embriones de *Drosophila*; o mediante un sistema *in vitro* derivado de células S2. El uso de lisados celulares o procesamiento *in vitro* puede implicar además el aislamiento posterior de los ARNip de 21-23 nucleótidos, cortos, del lisado, etc., haciendo el proceso algo molesto y caro. La

síntesis química continúa preparando dos oligómeros de ARN monocatenario seguido de la hibridación de los dos oligómeros monocatenarios en un ARN bicatenario. Los métodos de síntesis química son diversos. Se proporcionan ejemplos no limitantes en las Patentes de Estados Unidos 5.889.136, 4.415.723 y 4.458.066 y en Wincott *et al.* (1995).

Se han sugerido varias modificaciones adicionales de secuencias de ARNip para alterar su estabilidad o mejorar su eficacia. Se sugiere que ARN de 21 unidades complementarios sintéticos que tienen salientes dinucleotídicos (es decir, 19 nucleótidos complementarios + dímeros no complementarios 3') pueden proporcionar el mayor nivel de supresión. Estos protocolos usan principalmente una secuencia de dos nucleótidos de timidina (2'-desoxi) como los salientes dinucleotídicos. Estos salientes dinucleotídicos se escriben con frecuencia como dTdT para distinguirlos de los nucleótidos típicos incorporados en ARN. La bibliografía ha indicado que el uso de salientes de dT está principalmente motivado por la necesidad de reducir el coste de los ARN sintetizados químicamente. También se sugiere que los salientes de dTdT podrían ser más estables que los salientes de UU, aunque los datos disponibles muestran solamente una mejora ligera (<20 %) del saliente de dTdT en comparación con un ARNip con un saliente de UU.

Los documentos WO 99/32619 y WO 01/68836 sugieren que el ARN para uso en ARNip puede sintetizarse químicamente o enzimáticamente.

La síntesis enzimática contemplada en estas referencias es mediante una ARN polimerasa celular o una ARN polimerasa de bacteriófago (por ejemplo, T3, T7, SP6) mediante el uso y producción de una construcción de expresión como se conoce en la técnica. Por ejemplo, véase Patente de Estados Unidos 5.795.715. Las construcciones contempladas proporcionan moldes que producen ARN que contienen secuencias de nucleótidos idénticas a una parte del gen diana. La longitud de secuencias idénticas proporcionadas por estas referencias es de al menos 25 bases, y puede ser de hasta 400 o más bases de longitud. Un aspecto importante de esta referencia es que los autores contemplan digerir ARNbc más largos hasta longitudes de 21-25 unidades con el complejo de nucleasa endógena que convierte ARNbc largos en ARNip *in vivo*. No describen ni presentan datos para sintetizar y usar ARNbc de 21-25 unidades transcritos *in vitro*. No se realiza ninguna distinción entre las propiedades esperadas de ARNbc sintetizado química o enzimáticamente en su uso en la interferencia de ARN.

De forma similar, el documento WO 00/44914 sugiere que pueden producirse cadenas individuales de ARN enzimáticamente o mediante síntesis orgánica parcial/total. Particularmente, se sintetiza enzimáticamente ARN monocatenario a partir de los productos de PCR de un molde de ADN, particularmente un molde de ADNc clonado y el producto de ARN es una transcrito completo del ADNc, que puede comprender cientos de nucleótidos. El documento WO 01/36646 no sitúa ninguna limitación en el modo en que se sintetiza el ARNip, siempre que el ARN pueda sintetizarse *in vitro* o *in vivo*, usando procedimientos manuales y/o automáticos. Esta referencia también posibilita que la síntesis *in vitro* pueda ser química o enzimática, por ejemplo usando ARN polimerasa clonada (por ejemplo, T3, T7, SP6) para transcripción del molde de ADN endógeno (o ADNc), o una mezcla de ambos. De nuevo, no se hace ninguna distinción en las propiedades deseables para su uso en interferencia de ARN entre ARNip sintetizado química o enzimáticamente.

La Patente de Estados Unidos 5.795.715 informa de la transcripción simultánea de dos cadenas de secuencias de ADN complementarias en una única mezcla de reacción, en la que los dos transcritos se hibridan inmediatamente. Los moldes usados son particularmente de entre 40 y 100 pares de bases, y que están equipados en cada extremo con una secuencia promotora. Los moldes se unen particularmente a una superficie sólida. Después de transcripción con ARN polimerasa, los fragmentos de ARNbc resultantes pueden usarse para detectar y/o ensayar secuencias diana de ácido nucleico.

La Solicitud de Patente de Estados Unidos 20050203047 informa de un método para modular la expresión génica mediante interferencia de ARN incorporando una secuencia de ARNip o miARN en una secuencia que codifica ARN de transferencia (ARNt). El ARNt que contiene la secuencia de ARNip o miARN puede incorporarse en una construcción de expresión de ácido nucleico de modo que esa secuencia se corte y empalme a partir del ARNt expresado. La secuencia de ARNip o miARN puede situarse dentro de un intrón asociado con un transcrito de ARNt no procesado, o puede situarse en uno de los extremos del transcrito de ARNt.

Puede prepararse un ácido nucleico por cualquier técnica conocida por un experto habitual en la materia, tal como por ejemplo, síntesis química, producción enzimática o producción biológica. Los ejemplos no limitantes de un ácido nucleico sintético (por ejemplo, un oligonucleótido sintético), incluyen un ácido nucleico preparado por síntesis química *in vitro* usando química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita y técnicas de fase sólida tales como las descritas en el documento EP 266 032, o mediante intermedios de desoxinucleósido H-fosfonato como se describe en Froehler *et al.* (1986) y Patente de Estados Unidos 5.705.629.

Pueden usarse diversos mecanismos de síntesis de oligonucleótidos, tales como los métodos desvelados en las Patentes de Estados Unidos 4.659.774; 4.816.571; 5.141.813; 5.264.566; 4.959.463; 5.428.148; 5.554.744; 5.574.146; 5.602.244.

Un ejemplo no limitante de un ácido nucleico producido enzimáticamente incluye ácidos nucleicos producidos por enzimas en reacciones de amplificación tales como PCR™ (véase por ejemplo, Patentes de Estados Unidos 4.683.202 y 4.682.195), o la síntesis de un oligonucleótido descrito en la Patente de Estados Unidos 5.645.897. Un ejemplo no limitante de un ácido nucleico producido biológicamente incluye un ácido nucleico recombinante producido (es decir, replicado) en una célula viva, tal como un vector de ADN recombinante replicado en bacterias (véase por ejemplo Sambrook *et al.* 2001).

## B. Otras terapias

### 1. Cirugía

Aproximadamente 60 % de las personas con cáncer se someterán a cirugía de algún tipo, que incluye cirugía preventiva, de diagnóstico o estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento de cáncer que puede usarse junto con otras terapias, tales como el tratamiento como se desvela en el presente documento, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas.

La cirugía curativa incluye resección en la que todo o parte del tejido canceroso se retira, escinde y/o destruye físicamente. La resección tumoral se refiere a la retirada física de al menos parte de un tumor. Además de la resección tumoral, el tratamiento por cirugía incluye cirugía láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs). Se contempla además que la presente divulgación puede usarse junto con la retirada de cánceres superficiales, precánceres o cantidades adicionales de tejido normal.

Inyección intratumoral antes de la cirugía o tras escisión de parte de todas de las células cancerosas, tejido o tumor, puede formarse una cavidad en el cuerpo. Puede conseguirse tratamiento mediante perfusión, inyección directa o aplicación local de estas áreas con una terapia antineoplásica adicional. Dicho tratamiento puede repetirse, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Estos tratamientos también pueden ser de diversas dosificaciones.

### 2. Quimioterapia

Pueden usarse una amplia diversidad de agentes quimioterapéuticos de acuerdo con la presente divulgación. El término "quimioterapia" se refiere al uso de fármacos para tratar cáncer. Un "agente quimioterapéutico" se usa para indicar un compuesto o composición que se administra en el tratamiento del cáncer. Estos agentes o fármacos se clasifican por su modo de actividad dentro de una célula, por ejemplo, si y en qué estadio afectan al ciclo celular. Como alternativa, un agente puede caracterizarse basándose en su capacidad para reticular directamente con ADN, para intercalarse en ADN o para inducir aberraciones cromosómicas y mitóticas afectando a síntesis de ácido nucleico. La mayoría de agentes quimioterapéuticos quedan en las siguientes categorías: agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, inhibidores mitóticos y nitrosoureas.

#### a. Agentes alquilantes

Los agentes alquilantes son fármacos que interaccionan directamente con ADN genómico para evitar que la célula cancerosa proliferare. Esta categoría de fármacos quimioterapéuticos representa agentes que afectan a todas las fases del ciclo celular, es decir, no son específicos de fase. Los agentes alquilantes pueden implementarse para tratar leucemia crónica, linfoma no de Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple y cánceres particulares de mama, pulmón y ovario. Incluyen: busulfán, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida (citoxán), dacarbazina, ifosfamida, mecloretamina (mustargen) y melfalán. Puede usarse troglitazona para tratar el cáncer en combinación con uno cualquiera o más de estos agentes alquilantes, algunos de los cuales se analizan posteriormente.

#### b. Antimetabolitos

Los antimetabolitos alteran la síntesis de ADN y ARN. A diferencia de los agentes alquilantes, influyen específicamente en el ciclo celular durante la fase S. Se han usado para combatir leucemias crónicas además de tumores de mama, ovario y el tracto gastrointestinal. Los antimetabolitos incluyen 5-fluorouracilo (5-FU), citarabina (Ara-C), fludarabina, gemcitabina y metotrexato.

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

#### c. Antibióticos antitumorales

Los antibióticos antitumorales tienen actividad tanto antimicrobiana como citotóxica. Estos fármacos también

interfieren con ADN inhibiendo químicamente enzimas y mitosis o alterando membranas celulares. Estos agentes no son específicos de fase de modo que actúan en todas las fases del ciclo celular. Por lo tanto, se usan ampliamente para una diversidad de cánceres. Los ejemplos de antibióticos antitumorales incluyen bleomicina, dactinomina, daunorrubicina, doxorubicina (adriamicina) e idarrubicina, algunos de los cuales se analizan en más detalle posteriormente. Estos compuestos ampliamente usados en situaciones clínicas para el tratamiento de neoplasias se administran mediante inyecciones de embolada por vía intravenosa a dosis que varían de 25 a 75 mg/m<sup>2</sup> en intervalos de 21 días para adriamicina, a 35-100 mg/m<sup>2</sup> para etopósido por vía intravenosa o por vía oral.

#### d. Inhibidores mitóticos

Los inhibidores mitóticos incluyen alcaloides vegetales y otros agentes naturales que pueden inhibir la síntesis de proteínas requerida para división celular o mitosis. Actúan durante una fase específica durante el ciclo celular. Los inhibidores mitóticos comprenden docetaxel, etopósido (VP16), paclitaxel, taxol, taxotere, vinblastina, vincristina y vinorelbina.

#### e. Nitrosoureas

Las nitrosoureas, como agentes alquilantes, inhiben proteínas de reparación de ADN. Se usan para tratar linfomas no de Hodgkin, mieloma múltiple, melanoma maligno, además de tumores cerebrales. Los ejemplos incluyen carmustina y lomustina.

#### f. Otros agentes

Otros agentes que pueden usarse incluyen bevacizumab (nombre comercial Avastin®), gefitinib (Iressa®), trastuzumab (Herceptin®), cetuximab (Erbix®), panitumumab (Vectibix®), bortezomib (Velcade®) y Gleevec. Además, los inhibidores de factores de crecimiento e inhibidores de moléculas pequeñas quinasa también tienen utilidad en la presente invención. Todas las terapias se describen en *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (7ª Ed.), 2004, y *Clinical Oncology* (3ª Ed., 2004). También están abarcadas las siguientes terapias adicionales.

La inmunoterapia, en general, se basa en el uso de células efectoras inmunitarias y moléculas para dirigirse a y destruir células cancerosas. El efector inmunitario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo por sí solo puede actuar como un efector de terapia o puede reclutar otras células para efectuar realmente la destrucción celular. El anticuerpo también puede estar conjugado con un fármaco o una toxina (producto quimioterapéutico, radionúclido, cadena de ricina A, toxina del cólera, toxina de pertussis, etc.) y actuar únicamente como un agente de dirección. Como alternativa, el efector puede ser un linfocito que porta una molécula de superficie que interacciona, directa o indirectamente, con una diana celular tumoral. Diversas células efectoras incluyen linfocitos T citotóxicos y linfocitos NK.

La inmunoterapia, por lo tanto, podría usarse como parte de una terapia combinada, junto con terapia génica de p53. El enfoque general para terapia combinada se analiza posteriormente. En general, la célula tumoral debe portar algún marcador que sea susceptible de dirección, es decir, no está presente en la mayoría de otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos podría ser adecuado para dirección en el contexto de la presente invención. Los marcadores tumorales habituales incluyen antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno asociado a tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno de Sialilo de Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógenos, receptor de laminina, *erb B* y p155. Además, p53 en sí mismo puede ser una diana inmunoterapéutica. Véase Publicación de Estados Unidos 2005/0171045.

El Factor de Necrosis Tumoral es una glucoproteína que destruye algún tipo de células cancerosas, activa la producción de citocinas, activa macrófagos y células endoteliales, promueve la producción de colágeno y colagenasas, es un mediador inflamatorio y también un mediador de choque séptico, y promueve el catabolismo, la fiebre y el sueño. Algunos agentes infecciosos provocan regresión tumoral mediante la estimulación de producción de TNF. TNF puede ser bastante tóxico cuando se usa solo en dosis eficaces, de modo que los regímenes óptimos probablemente lo usen en dosis menores en combinación con otros fármacos. Sus acciones inmunosupresoras están potenciadas por interferón gamma, de modo que la combinación es potencialmente peligrosa. También se ha descubierto que un híbrido de TNF e interferón  $\alpha$  posee actividad antineoplásica.

El uso de hormonas sexuales de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento en el tratamiento de cáncer. Aunque los métodos descritos en el presente documento no se limitan al tratamiento de un cáncer específico, este uso de hormonas tiene beneficios con respecto a cánceres de mama, próstata y endometrio (revestimiento del útero). Los ejemplos de estas hormonas son estrógenos, antiestrógenos, progesteronas y andrógenos.

Las hormonas de corticosteroides son útiles en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (linfoma, leucemias y mieloma múltiple). Las hormonas corticosteroides pueden aumentar la eficacia de otros agentes quimioterapéuticos, y en consecuencia, se usan frecuentemente en tratamientos de combinación. La prednisona y dexametasona son ejemplos de hormonas corticosteroides.

### 3. Radioterapia

La radioterapia, también denominada terapia de radiación, es el tratamiento de cáncer y otras enfermedades con radiación ionizante. La radiación ionizante deposita energía que daña o destruye células en el área que se trata dañando su material genético, haciendo imposible que estas células continúen creciendo. Aunque la radiación daña tanto células cancerosas como células normales, estas últimas pueden repararse y funcionar apropiadamente. La radioterapia puede usarse para tratar tumores sólidos localizados, tales como cánceres de la piel, lengua, laringe, cerebro, mama o cuello uterino. También pueden usarse para tratar leucemia y linfoma (cánceres de las células formadoras de la sangre y el sistema linfático, respectivamente).

La terapia de radiación usada de acuerdo con la presente invención puede incluir, pero sin limitación, el uso de rayos  $\gamma$ , rayos X y/o el suministro dirigido de radioisótopos a células tumorales. Otras formas de factores que dañan el ADN también se contemplan tales como microondas e irradiación UV. Es más probable que todos estos factores efectúen un amplio intervalo de daño en el ADN, en los precursores de ADN, en la replicación y reparación de ADN, y en el ensamblaje y mantenimiento de cromosomas. Los intervalos de dosificación para rayos X varían de dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante periodos prolongados de tiempo (de 3 a 4 semanas), hasta dosis individuales de 2000 a 6000 roentgens. Los intervalos de dosificación para radioisótopos varían ampliamente, y dependen de la semivida del isótopo, la fuerza y el tipo de radiación emitida, y la captación por las células neoplásicas.

La radioterapia puede comprender el uso de anticuerpos radiomarcados para suministrar dosis de radiación directamente al sitio de cáncer (radioinmunoterapia). Los anticuerpos son proteínas altamente específicas que se fabrican por el cuerpo en respuesta a la presencia de antígenos (sustancias reconocidas como ajenas por el sistema inmunitario). Algunas células tumorales contienen antígenos específicos que desencadenan la producción de anticuerpos específicos de tumores. Pueden prepararse grandes cantidades de estos anticuerpos en el laboratorio y unirse a sustancias radiactivas (un proceso conocido como radiomarcaje). Una vez inyectados en el cuerpo, los anticuerpos buscan activamente las células cancerosas, que se destruyen por la acción de destrucción celular (citotóxica) de la radiación. Este enfoque puede minimizar el riesgo de daño por radiación a células sanas.

La radioterapia conformal usa la misma máquina de radioterapia, un acelerador lineal, como el tratamiento de radioterapia normal pero se colocan bloques metálicos en la ruta del haz de rayos X para alterar su forma para que coincida con la del cáncer. Esto asegura que se proporcione una mayor dosis de radiación al tumor. Las células circundantes sanas y estructuras cercanas reciben una dosis menor de radiación, de modo que se reduce la posibilidad de efectos secundarios. Se ha desarrollado un dispositivo denominado colimador multihoja y puede usarse como una alternativa a los bloques metálicos. El colimador multihoja consiste en varias láminas metálicas que se fijan al acelerador lineal. Cada capa puede ajustarse de modo que los haces de radioterapia puedan adaptarse al área de tratamiento sin necesidad de bloques metálicos. La colocación precisa de la máquina de radioterapia es muy importante para el tratamiento de radioterapia conformal y puede usarse una máquina de exploración especial para comparar la posición de los órganos internos al comienzo de cada tratamiento.

La radioterapia de intensidad modulada de alta resolución también usa un colimador multihoja. Durante este tratamiento las capas del colimador multihoja se mueven mientras se está proporcionando el tratamiento. Este método probablemente alcance adaptación más precisa de los haces de tratamiento y permita que la dosis de radioterapia sea constante sobre el área de tratamiento completa.

Aunque estudios de investigación han mostrado que la radioterapia conformal y radioterapia de intensidad modulada pueden reducir los efectos secundarios del tratamiento con radioterapia, es posible que la adaptación al área de tratamiento de forma tan precisa pueda detener las células cancerosas microscópicas fuera del área de tratamiento que se destruye. Esto significa que el riesgo de que el cáncer regrese en el futuro puede ser mayor con estas técnicas de radioterapia especializadas. Se usa radioterapia estereotáctica para tratar tumores cerebrales. Esta técnica dirige la radioterapia de muchos ángulos diferentes de modo que la dosis que va al tumor es muy alta y la dosis que afecta al tejido sano circundante es muy baja. Antes del tratamiento, se analizan varias exploraciones por ordenador para asegurar que la radioterapia se dirige con precisión, y la cabeza del paciente se mantiene quieta en un marco especialmente preparado mientras recibe la radioterapia. Se proporcionan varias dosis.

La radiocirugía estereotáctica (cuchillo gamma) para el cerebro y otros tumores no usa un cuchillo, sino que dirige con mucha precisión haces de radioterapia gamma desde cientos de ángulos diferentes. Es necesaria una única sesión de radioterapia, que tarda de aproximadamente cuatro a cinco horas. Para este tratamiento se ajustará a la cabeza un marco metálico especialmente preparado. Después se llevan a cabo varias exploraciones y rayos X para encontrar el área precisa en la que se necesita el tratamiento. Durante la radioterapia para tumores cerebrales, el paciente reposa con su cabeza en un casco grande, que tiene cientos de agujeros en él para permitir que pasen los haces de radioterapia. Enfoques relacionados permiten la colocación para el tratamiento de tumores en otras áreas del cuerpo.

Los científicos también están buscando modos de aumentar la eficacia de la terapia de radiación. Se están estudiando dos tipos de fármacos de investigación con respecto a su efecto en células que se someten a radiación. Los radiosensibilizadores hacen a las células tumorales más propensas al daño, y los radioprotectores protegen tejidos normales de los efectos de la radiación. La hipertermia, el uso de calor, también se está estudiando con respecto a su eficacia en la sensibilización de tejido a la radiación.

**V. Ejemplos**

Se incluyen los siguientes ejemplos para ilustrar adicionalmente diversos aspectos de la invención. Los expertos en la materia deberían apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos a continuación representan técnicas y/o composiciones que el inventor ha descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención, y por lo tanto puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica.

**Ejemplo 1 - El tratamiento de Advexin® se compara favorablemente con el beneficio de supervivencia general obtenido con terapias aprobadas**

Los pacientes con SCCHN que tienen reparación locorregional experimentan invariablemente morbilidad relacionada con tumores sustancial. No se puede enfatizar demasiado la necesidad de tratamientos mejorados para obtener control de la progresión regional y conservar la función en esta población de pacientes. En pacientes que han sufrido fracasos con radiación previa y se consideran no resecables, la quimioterapia se acepta como un enfoque de tratamiento convencional. El objetivo principal del tratamiento de tumor recurrente es la paliación de los síntomas.

Se han usado varios regímenes de monoterapia molecular dirigida y quimioterapia en el cuidado convencional de SCCHN recurrente con resultados resumidos en comparación con Advexin® en la tabla posterior. La mediana de la supervivencia general para Advexin® y terapias de tratamiento de referencia son similares (aproximadamente 5-6 meses) y superan las medianas de tasas de supervivencia históricas sin tratamiento (aproximadamente 3-4 meses). (Etiqueta de Producto de Estados Unidos Tarceva®, Etiqueta de Producto de Estados Unidos Erbitux®, 2007).

**Tabla 1: mediana de supervivencia general en el estudio de monoterapia en SCCHN (población de ITT)**

Fármaco	Dosis/Ciclo	Mediana de la Supervivencia General (meses)
Metotrexato	40 - 60 mg/m <sup>2</sup> IV	4,2-5,6
Cisplatino/5FU	60-100 mg/m <sup>2</sup> /600 - 1000 mg/m <sup>2</sup> IV	5,6-6,4
Carboplatino/5FU	300 - 400 mg/m <sup>2</sup> /600 - 1000 mg/m <sup>2</sup> IV	5,0
Docetaxel	100 mg/m <sup>2</sup> IV	6,6
Paclitaxel	135-175 mg/m <sup>2</sup> IV	4,4
Cetuximab	400 mg/m <sup>2</sup> IV inicialmente 250 mg/m <sup>2</sup> IV semanalmente	5,8
Erlotinib	150 mg p.o.	5,8
<b>Ensayos Fundamentales de Advexin®</b>	<b>&gt;2x10<sup>11</sup> - ≥ 2x10<sup>12</sup> vp/día IT</b>	<b>5,X</b>
<b>Ensayos Fundamentales de Advexin® Perfiles de Biomarcadores de p53 Favorables</b>	<b>&gt;2x10<sup>11</sup> - ≥ 2x10<sup>12</sup> vp/día IT</b>	<b>8,5</b>

Resulta importante que la mediana de supervivencia de 8,5 meses de pacientes tratados con Advexin® con perfiles de biomarcadores de p53 predictivos de eficacia de Advexin® es superior a la supervivencia general de tratamientos convencionales (aproximadamente 5 a 6 meses). Sin embargo, los perfiles de biomarcadores que se esperaba que predijeran la eficacia de Advexin® no predijeron la eficacia de metotrexato. Además, Advexin® tuvo un perfil de seguridad superior en comparación con tratamientos convencionales que con frecuencia suman a las morbilidades tumorales. Estas ventajas importantes de la terapia de Advexin® se aclaran y describen en más detalle en las secciones posteriores.

**Ejemplo 2 - Advexin® tiene un perfil de seguridad superior en comparación con terapias convencionales**

Los datos de seguridad compilados a partir de miles de administraciones en más de 400 pacientes demuestran que Advexin® es un tratamiento antineoplásico muy bien tolerado y la mayoría de acontecimientos adversos son de naturaleza local, autolimitantes y/o susceptibles de tratamiento de cuidados paliativos. El perfil de efectos secundarios es diferente del de quimioterapias sistémicas y tratamientos de anticuerpos monoclonales para los que

los acontecimientos adversos con frecuencia pueden ser limitantes de dosis y podrían potencialmente desarrollarse en secuelas con más peligro para la vida que los acontecimientos locales, y con frecuencia autolimitantes, observados con terapia de Advexin®. Se demostró que Advexin® era seguro tanto en hombres como en mujeres y a través de un amplio intervalo de edad de dosis. No se observaron diferencias clínicamente significativas en el perfil de acontecimientos adversos de Advexin® para sexo o edad.

La tasa de acontecimientos adversos graves relacionados con Advexin® fue muy baja. Para pacientes con SCCHN tratados con Advexin®, el acontecimiento adverso más frecuentemente presentado fue fiebre (2,9 % de todos los pacientes con SCCHN). Para pacientes tratados en el estudio de SCCHN de Fase III, los acontecimientos adversos graves relacionados con Advexin® incluyeron disnea (6,6 %) y fiebre (4,9 %). Los acontecimientos de grado 3 o 4 más frecuentemente indicados para pacientes con SCCHN que toman Advexin®, independientemente de la causalidad, fueron dolor en el sitio de inyección y dolor general. En el estudio de Fase III, los acontecimientos de Grado 3 o 4 de Advexin® se relacionaron en general con la administración local de inyección de Advexin® (dolor en el sitio de inyección), y estos acontecimientos fueron con frecuencia autolimitantes y/o susceptibles de infiltración anestésica local profiláctica en el sitio antes de la inyección, así como el uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos y analgésicos sin receta. La incidencia de cambios de laboratorio de Grado 3 o 4 para pacientes tratados con Advexin® también fue baja. Un total de 49 (18,9 %) de los pacientes tratados en todos los estudios de SCCHN de Advexin® presentaron un cambio de laboratorio de Grado 3 o 4 desde la línea basal.

En el mismo estudio, más pacientes con metotrexato presentaron acontecimientos de grado 3 o 4 que estaban relacionados con administración de metotrexato sistémico (estomatitis, neumonía, leucopenia). Los acontecimientos adversos sistémicos asociados con tratamiento con metotrexato pueden conducir a secuelas potencialmente con peligro para la vida y son potencialmente más peligrosos que los acontecimientos locales, y con frecuencia autolimitantes, observados con terapia de Advexin®. Además, como se esperaba para los pacientes con metotrexato tratados en el estudio de SCCHN de fase III, se vio una mayor incidencia de acontecimientos de laboratorio de grado 3 o 4 (39,5 %) que para pacientes tratados con Advexin® en el mismo estudio (19,2 %). Estos acontecimientos incluyeron leucopenia (12,1 % de pacientes con metotrexato), neutropenia (12,1 %) y linfopenia (25,6 %). Para pacientes con metotrexato en el estudio de fase III, se observaron mayores incidencias de estomatitis, náuseas, neumonía, parestesia, leucopenia y neutropenia en relación con Advexin®. Las mayores tasas de estomatitis y náuseas asociadas con terapia de metotrexato pueden tener añadidas morbilidades tumorales que conducen a consumo nutricional más escaso para estos pacientes y se observó mayor pérdida de peso corporal a lo largo del tiempo para pacientes con metotrexato que para pacientes con Advexin® tratados en el estudio de SCCHN de fase III.

Resulta importante que los acontecimientos adversos sistémicos y anomalías de laboratorio que se sabe que están asociados con el uso de terapia de metotrexato, son potencialmente más peligrosos y con más secuelas con peligro para la vida que los acontecimientos locales, y con frecuencia autolimitantes, observados con terapia de Advexin®. A este respecto, ningún paciente murió debido a tratamiento con Advexin®, sin embargo, en el estudio de SCCHN recurrente de fase III, se atribuyó una muerte, debida a leucopenia, a metotrexato. Además, se permitió a los pacientes en la rama de metotrexato de este estudio reducir la dosis para toxicidad, lo que probablemente evitó una incidencia aún mayor de acontecimientos adversos graves individuales para pacientes con metotrexato.

Advexin® administrado IT no empeoró las toxicidades de agentes quimioterapéuticos administrados de forma habitual (docetaxel, doxorubicina o cisplatino) o terapia de radiación cuando se proporciona conjuntamente para el tratamiento de "otros" tipos tumorales, incluyendo cáncer de mama localmente avanzado, cáncer de próstata, cáncer colorrectal (CRC), o cáncer de pulmón no microcítico avanzado (NSCLC). Los datos de seguridad proporcionados para pacientes que recibieron radio o quimioterapia simultáneamente con Advexin® demostraron que podría combinarse Advexin® con estas modalidades de tratamiento con un perfil de seguridad aceptable. Resulta importante que no se observó ningún empeoramiento de las toxicidades de estos agentes habitualmente usados cuando se administraron en combinación con Advexin®.

En conclusión, el único perfil de seguridad clínica favorable indica que Advexin® es una terapia altamente segura y bien tolerada cuando se administra IT a una dosis de  $2 \times 10^{12}$  partículas virales a pacientes con SCCHN recurrente o refractario. Los acontecimientos adversos de Advexin® fueron con frecuencia autolimitantes y/o susceptibles de tratamiento anestésico local profiláctico, así como el uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos y analgésicos sin receta. Este perfil de seguridad bien tolerado contrasta con los acontecimientos adversos sistémicos que se sabe que están asociados con terapias sistémicas de SCCHN recurrente convencionales que pueden desarrollar potencialmente más secuelas con peligro para la vida que los acontecimientos locales, y con frecuencia autolimitantes, observados con tratamiento con Advexin®.

**Ejemplo 3 – Los que responden a Advexin® tienen supervivencia aumentada de forma estadísticamente significativa en pacientes con SCCHN recurrentes refractarios para tratamientos aprobados**

**La respuesta de control de crecimiento tumoral se correlaciona con supervivencia aumentada de forma estadísticamente significativa después de terapia con Advexin®.** De acuerdo con los hallazgos de Lara *et al.* (2008), la terapia de Advexin® en las poblaciones de ITT de ensayos fundamentales tanto de T301 como de T201

dio como resultado supervivencia aumentada de una manera altamente significativa para pacientes con respuestas de control de crecimiento tumoral (RC + RP + EE) en comparación con ausencia de respuesta en pacientes con SCCHN recurrente que eran refractarios para otras terapias.

5 En el ensayo fundamental de fase 3 de Advexin® T301, hubo un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia para pacientes con respuestas de TGC en comparación con ausencia de respuesta (mediana de supervivencia de pacientes con respuesta de TGC 7,6 meses frente a ausencia de respuesta 2,9 meses,  $p = 0,0002$ ). Estos resultados se representan en el análisis de Kaplan-Meier en la FIG. 5.

10 Se observaron resultados similares en el ensayo fundamental de Advexin® T201 y también hubo un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia para pacientes con respuestas de TGC en comparación con ausencia de respuesta (mediana de la supervivencia de pacientes con respuesta de TGC 6,7 meses frente a ausencia de respuesta 3,6 meses,  $p = 0,0269$ ). Estos resultados se muestran en el análisis de Kaplan-Meier en la FIG. 6.

15 Un análisis similar de la población de pacientes ITT de ensayos clínicos fundamentales T301 y T201 combinados que consistía en 175 pacientes tratados con Advexin® reveló un aumento altamente estadísticamente significativo en la supervivencia para los pacientes con respuesta de TGC frente a ausencia de respuesta (mediana de la supervivencia de pacientes con respuesta de TGC 7,0 meses frente a ausencia de respuesta 3,0 meses,  $p < 0,0001$ ). Estos hallazgos se muestran en el análisis de Kaplan-Meier en la FIG. 7.

20 La Tabla 2 resume los resultados de esos análisis y proporciona los datos correspondientes para pacientes tratados con metotrexato en el estudio fundamental de fase 3 T301. Los pacientes tratados con metotrexato también mostraron un aumento de la mediana de supervivencia para los pacientes con respuestas de TGC (7,5 meses) en comparación con ausencia de respuesta (3,8 meses) pero la diferencia no fue estadísticamente significativa mediante análisis de rangos logarítmicos ( $p = 0,1560$ ). Estos datos claramente indican un beneficio de supervivencia estadísticamente significativo para pacientes que consiguieron una respuesta de TGC después de terapia de Advexin®. Este resultado de eficacia importante se demostró con alta significación estadística en dos ensayos controlados aleatorios, independientes, de terapia de Advexin® en pacientes con SCCHN recurrente, de estadio tardío, con opciones de tratamiento alternativas limitadas.

30

**Tabla 2: Correlación de control de crecimiento tumoral con supervivencia en poblaciones ITT con SCCHN recurrente tratadas con Advexin®**

Rama de ensayo	n.º de pacientes	% de control del crecimiento tumoral	Mediana de supervivencia (meses) (IC 95 %)		P valor (rangos logarítmicos)
			Respuesta	Sin respuesta	
Advexin T301	63	57,1	7,6	2,9	0,0002
Advexin T201	112	61,6	6,7	3,6	0,0269
Advexin T301 + T201	175	60,0	7,0	3,0	<0,0001
Metotrexato	60	53,3	7,5	3,8	0,1560

35 El análisis de la correlación de supervivencia aumentada con respuestas tumorales definidas por los criterios de Choi (2007) (reducción de tamaño tumoral de  $\geq 10\%$ ) también demostró un aumento altamente estadísticamente significativo en la supervivencia para los pacientes que respondían en comparación con los que no respondían en la población de pacientes ITT de ensayos clínicos fundamentales T301 y T201 combinados consistente en 175 pacientes tratados con Advexin® (mediana de pacientes que responden con supervivencia  $\geq 10\%$  de reducción tumoral 11,2 meses frente a ausencia de respuesta 5,1 meses,  $p = 0,0010$ ). Estos hallazgos se muestran en el análisis de Kaplan-Meier en la FIG. 8.

40 Las definiciones convencionales de respuesta tumoral ( $\geq 50\%$  de reducción en el tamaño tumoral) también demostraron un aumento altamente estadísticamente significativo en la supervivencia para los que respondían en comparación con los que no respondían en los pacientes tratados con Advexin® (N = 175) ITT de ensayos clínicos fundamentales T301 y T201 combinados. La mediana de supervivencia para pacientes que respondían con  $> 50\%$  de reducción tumoral fue de 41,0 meses frente a 5,8 meses para pacientes que no respondían,  $p = 0,0049$  (FIG. 9).

45 Como se muestra en la Tabla 3, también se observaron correlaciones similares entre respuestas tumorales definidas por reducciones tumorales de  $> 10\%$  y  $> 50\%$  para la población de ITT tratada con metotrexato. El porcentaje de pacientes con respuestas de TGC fue similar para poblaciones tratadas tanto con Advexin® como con metotrexato (Advexin® = 60,0 % frente a metotrexato = 53,3 %). Como se esperaba a partir de sus mecanismos conocidos de acción, una mayor proporción de los pacientes con respuestas de TGC en la población de Advexin® tuvieron respuestas de detención del ciclo celular/senescencia mientras que la población de metotrexato tuvo una mayor proporción de respuestas apoptóticas con reducciones de tamaño tumoral. Resulta interesante que los pacientes tratados con Advexin® con respuestas tumorales apoptóticas que resultaban en  $\geq 50\%$  de reducción del tamaño tumoral tuvieron una mediana de supervivencia notable de 41,0 meses en comparación con 14,4 meses para pacientes tratados con metotrexato con reducciones similares del tamaño tumoral.

**Tabla 3: Correlación de respuesta tumoral con supervivencia en poblaciones ITT con SCCHN recurrente**

Población/respuesta	Nº de pacientes	% de respuesta tumoral	Mediana de la supervivencia (meses) (IC 95 %)		P valor (rangos logarítmicos)
			Respuesta	Sin respuesta	
Advexin T301 + T201 TGC	175	60,0	7,0	3,0	<0,0001
Metotrexato TGC	60	53,3	7,5	3,8	0,1560
Advexin T301 + T201 ≥ 10 %	175	10,3	11,2	5,1	0,0010
Metotrexato ≥ 10 %	60	18,3	11,9	4,3	0,0594
Advexin T301 + T201 ≥ 50 %	175	4,0	41,0	5,8	0,0049
Metotrexato ≥ 50 %	60	11,7	14,4	4,6	0,0397

En general, estos datos proporcionan pruebas sustanciales de eficacia tanto para Advexin® como para metotrexato en pacientes con SCCHN recurrente. Las respuestas tumorales para ambos agentes definidas por una diversidad de criterios claramente demuestran un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia para pacientes que responden en comparación con los que no responden. No se producen remisiones espontáneas en SCCHN recurrente y las reducciones del tamaño tumoral observadas en estas poblaciones fueron por lo tanto debidas a estos agentes terapéuticos. De forma coherente con los principios importantes demostrados por Lara *et al.* (2007) y Choi *et al.* (2007), las respuestas tumorales para ambos agentes definidas por el control del crecimiento tumoral o reducciones del tamaño tumoral  $\geq 10\%$  fueron predictores más sensibles de la supervivencia aumentada en comparación con criterios de reducción del tamaño tumoral  $\geq 50\%$  convencionales.

Es importante darse cuenta de que con respecto a las necesidades médicas no satisfechas de pacientes con SCCHN recurrente, la identificación de agentes adicionales con eficacia es crítica ya que el fracaso del tratamiento con terapias existentes es casi universal. Las comparaciones de la eficacia relativa entre estos agentes es un asunto secundario que puede influir en la secuencia en la que se administran estos agentes. Son factores adicionales importantes en la selección de agentes para terapia las toxicidades potenciales y se ha demostrado claramente que el perfil de seguridad de Advexin® tiene ventajas en comparación con terapias tradicionales. Otro determinante en la selección de las terapias más apropiadas para pacientes con SCCHN recurrente son biomarcadores que pueden predecir la eficacia terapéutica de tratamientos disponibles. Como se describe posteriormente, los perfiles de biomarcadores de p53 que predicen la eficacia de Advexin® e indican que los pacientes se benefician de Advexin® y metotrexato tienen diferentes perfiles moleculares. Estos hallazgos tienen importantes implicaciones para orientar el tratamiento de los pacientes individuales con Advexin® y metotrexato.

#### **Ejemplo 4 – Biomarcadores basados en el mecanismo de acción de Advexin® predicen la eficacia de Advexin® e identifican pacientes que se benefician más probablemente del tratamiento con Advexin® con respuestas tumorales aumentadas y supervivencia, pero no predicen la eficacia de otros tratamientos**

La iniciativa de ruta crítica de la FDA y la iniciativa de cualificación de biomarcadores de oncología del departamento de salud y servicios humanos de Estados Unidos han promovido la identificación de nuevos biomarcadores clínicos y moleculares que predigan la eficacia terapéutica para orientar la aplicación más apropiada de nuevas terapias y faciliten las aprobaciones de fármacos. El desarrollo de estas iniciativas ha dado como resultado la identificación de perfiles de biomarcadores de p53 predictivos de la eficacia de Advexin® en carcinoma de células escamosas recurrente de la cabeza y cuello que se describen en este informe.

Los perfiles de biomarcadores predictivos de la eficacia de Advexin® se basan en las configuraciones del gen de p53 evaluadas por análisis de secuencias y su nivel de expresión de proteínas determinado por inmunohistoquímica. Estas evaluaciones de biomarcadores de p53 se describieron en primer lugar en los resultados del ensayo clínico de Advexin® de fase 1 INT-002 en pacientes con SCCHN realizado e indicado por Clayman *et al.* (1998) y se incorporaron posteriormente en protocolos de ensayo clínico fundamentales y planes de análisis estadísticos. Los perfiles de p53 predictivos de la eficacia de Advexin® son coherentes con mecanismos conocidos de inactivación de p53 tumoral y la actividad de Advexin® como se describe posteriormente.

La FIG. 9 representa los dos mecanismos principales de inactivación de p53 tumoral y los perfiles de secuenciación inmunohistoquímica del gen de p53 asociados con estos tipos diferentes de anomalías de p53. La inactivación de p53 por mutación génica se asocia con una secuencia génica de p53 mutada que da como resultado una proteína p53 anómala que puede expresarse a niveles altos o bajos como se determina por inmunohistoquímica (FIG. 10, panel izquierdo). Como alternativa, cuando p53 se inactiva por regulación positiva de los inhibidores de p53 mdm-2 o mdm-4 (FIG. 10, panel derecho), la secuencia génica de p53 es de tipo silvestre y la proteína p53 normal resultante puede expresarse a niveles altos o bajos como se detecta por inmunohistoquímica.

**Perfiles de biomarcadores p53 favorables para eficacia de Advexin®.** En tumores con secuencias génicas de p53 de tipo silvestre, p53 típicamente se inactiva por regulación positiva de los inhibidores de p53 mdm-2 y/o mdm-4

(Valentin-Vega *et al.*, 2007). Estos hallazgos se han confirmado para los pacientes con SCCHN recurrente en ensayos fundamentales de Advexin®, teniendo el 93 % (27/29 pacientes evaluados) secuencias génicas de p53 de tipo silvestre que también tienen regulación positiva de mdm-2 y/o mdm-4. Se descubrió que los perfiles de biomarcadores de p53 con secuencias de p53 de tipo silvestre eran favorables para eficacia de Advexin® en Clayman *et al.* (1998). Como se representa en el diagrama en la FIG. 11, la combinación de p53 normal suministrada por Advexin® y p53 de tipo silvestre endógena producida por el tumor es suficiente para superar la inhibición de mdm-2/mdm-4.

Otro mecanismo importante de inactivación de p53 tumoral es mediante la mutación del gen de p53 que da como resultado la pérdida de función de p53. Como se muestra en la FIG. 12, la amplia mayoría de mutaciones de p53 (> 80 %) suceden en el dominio de unión a ADN de la molécula de p53.

p53 funcional es un tetrámero que requiere la combinación de cuatro moléculas de p53 normales que se unen mediante sus regiones de tetramerización. El tetrámero normalmente se une con ADN y regula posteriormente la expresión de otros genes que son responsables de la supresión tumoral. Como se representa en la FIG. 13 posterior, p53 con mutaciones en el dominio de unión a ADN no será funcional ya que estos tetrámeros no serán capaces de unirse con ADN.

Se descubrió que el perfil de biomarcadores de p53 con secuencia de p53 mutada y bajo nivel de expresión de proteína p53 por inmunohistoquímica (≤ 50 % de células tumorales positivas) era favorable para la eficacia de Advexin®. Como se ilustra en la FIG. 14 posterior, cuando los tumores tienen bajo nivel de expresión de p53 mutada, Advexin® puede proporcionar suficiente p53 normal para formar tetrámeros funcionales y restaurar la supresión de tumores por p53.

**Perfiles de biomarcadores de p53 desfavorables para eficacia de Advexin®.** Por el contrario, perfiles de biomarcadores de p53 con secuencia de p53 mutada y alto nivel de expresión de proteína p53 por inmunohistoquímica (> 50 % de células tumorales positivas) son desfavorables para eficacia de Advexin®. Esta observación es coherente con la asociación de estos perfiles de biomarcadores con el efecto negativo dominante de alto nivel de expresión de proteínas p53 con mutaciones de dominios de unión a ADN que se sabe que inhiben p53 normal suministrado por Advexin®. Como se representa en la FIG. 15, p53 con mutaciones en el dominio de unión a ADN puede inhibir p53 normal mediante la formación de heterotetrámeros no funcionales que son una mezcla de moléculas de p53 normales y mutadas. Esta es la base del efecto “negativo dominante” de mutaciones de p53 en el dominio de unión a ADN cuando se expresan a altos niveles (> 50 % de células tumorales positivas por inmunohistoquímica).

Por lo tanto, p53 normal suministrado por Advexin® se inhibe en tumores con alto nivel de expresión de proteína p53 mutada en el dominio de unión a ADN. Se espera que estos perfiles de marcadores de p53 “dominantes negativos” caracterizados por mutaciones de secuencia de p53 en el dominio de unión a ADN y altos niveles de proteína p53 por inmunohistología sean desfavorables para la eficacia de Advexin®.

En resumen, se espera que la presencia de configuraciones de genes de p53 de tipo silvestre y la ausencia de alto nivel de expresión de proteínas de mutaciones de p53 negativas dominantes sean predictivas de la eficacia de Advexin®. Estos perfiles de biomarcadores de p53 favorables y desfavorables son coherentes con mecanismos conocidos de acción de Advexin® e inactivación de p53 tumoral como se ha descrito anteriormente. La Tabla 4 resume las características de los perfiles de biomarcadores de p53 favorables y desfavorables para la eficacia de Advexin® definidas por evaluaciones de secuenciación e inmunohistoquímica de p53 combinadas. La naturaleza de las proteínas p53 asociadas y los mecanismos de eficacia de Advexin® e inactivación de p53 también se enumeran.

**Tabla 4 – Características de perfiles de biomarcadores de p53 favorables y desfavorables para la eficacia de Advexin®**

Perfiles de biomarcadores de p53			Tipo de proteína p53	Nivel de proteína p53	Mecanismos de acción
Eficacia de Advexin	Secuencia de p53	Inmunohistología de p53			
Favorable	Tipo silvestre	Negativa	Normal	Bajo	Advexin invierte inhibidores de p53 (mdm-2/4)
Favorable	Tipo silvestre	Positiva	Normal	Alto	
Favorable	Mutada	Negativa	Anómalo	Bajo	Advexin restaura la función de p53 mutada
Desfavorable	Mutada	Positiva	Anómalo	Alto	Advexin inhibida por efectos negativos dominantes

El mecanismo de acción de Advexin® se dirige a restauración de la función de p53 y se mostró que los perfiles de biomarcadores de p53 predictivos de la eficacia de Advexin® identificaban pacientes con respuestas tumorales aumentadas y supervivencia en análisis de datos de ensayos fundamentales. Los perfiles de biomarcadores predictivos de la eficacia de Advexin® se basaron en la evaluación de la configuración génica de p53 por análisis de

secuencia y su nivel de expresión proteica determinado por inmunohistoquímica. La presencia de configuraciones génicas de p53 de tipo silvestre y la ausencia de alto nivel de expresión de proteínas de mutaciones de p53 negativas dominantes fueron predictivas de la eficacia de Advexin®. La FIG. 16 representa estos perfiles de p53 favorables y desfavorables basándose en las evaluaciones de secuencia e inmunohistoquímica de p53.

Aproximadamente el 75 % de los pacientes con SCCHN recurrente tienen perfiles de biomarcadores de p53 favorables para la eficacia de Advexin® mientras que el 25 % tienen perfiles desfavorables. Como se ha descrito anteriormente, existe una asociación estadísticamente significativa de la respuesta tumoral con supervivencia aumentada en pacientes tratados con Advexin®. Basándose en los mecanismos conocidos de la inactivación de p53 tumoral y la eficacia de Advexin® anteriormente indicada, los inventores esperarían que los pacientes con perfiles de biomarcadores de p53 favorables demostrarían asociaciones estadísticamente significativas con respuestas de TGC y aumento de la mediana de supervivencia en comparación con pacientes con perfiles de p53 desfavorables. Estos son precisamente los resultados que se observaron con significación estadística muy alta como se describe posteriormente.

Resulta importante que estos perfiles de biomarcadores de p53 no predijeron resultados después de terapia de metotrexato lo que indica que no fueron únicamente marcadores de pronóstico para cualquier forma de tratamiento. Además, se descubrió que los perfiles moleculares de pacientes que se beneficiaban de la terapia con Advexin® y metotrexato eran diferentes y complementarios lo que tenía implicaciones importantes para orientar la terapia de pacientes con SCCHN recurrente con estos agentes.

**Los perfiles de biomarcadores de p53 para eficacia de Advexin® predicen el control de crecimiento tumoral en SCCHN recurrente.** Como se muestra en la Tabla 5, hubo una correlación altamente estadísticamente significativa entre los perfiles de p53 favorables para la eficacia de Advexin® y las respuestas de TGC después del tratamiento con Advexin®. Una proporción muy alta de pacientes tratados con Advexin® con perfiles de p53 favorables para eficacia de Advexin® tuvieron respuestas de TGC (79 %) en comparación con solamente el 25 % de pacientes con perfiles desfavorables para eficacia de Advexin® (p = 0,004 por ensayo exacto de Fisher).

**Tabla 5 – Los perfiles de biomarcadores de p53 para la eficacia de Advexin® predicen el control del crecimiento tumoral en cáncer SCCHN recurrente**

Los pacientes tratados con Advexin de INT-002, T201 y T301 con análisis preliminar de datos de perfil de p53	
Perfil de p53	Control de crecimiento tumoral
Favorable	45/57 (79 %)
Desfavorable	2/8 (25 %)
P valor de ensayo exacto de Fisher = 0,004	

La comparación del estado mutacional de p53 en pacientes con respuesta de TGC a tratamiento con Advexin® y metotrexato reveló diferencias en sus elementos moleculares lo que indica efectos beneficiosos en poblaciones diferentes de pacientes con SCCHN recurrente. Como se muestra en la Tabla 6, los pacientes con respuesta de TGC a metotrexato se asociaron con p53 mutada mientras que se observó lo opuesto para pacientes que respondían a Advexin® que tendían a tener una mayor proporción de perfiles de p53 de tipo silvestre.

**Tabla 6 – Se produce control de crecimiento tumoral en diferentes poblaciones de pacientes después de tratamiento con Advexin® y metotrexato (MTX)**

Pacientes tratados con Advexin T301A N = 31	
Estado génico de p53	Control de crecimiento tumoral
Tipo silvestre	12/14 (86 %)
Mutada	9/17 (53 %)
P valor de ensayo exacto de Fisher = 0,0580	

Pacientes tratados con metotrexato T301B N = 35	
Estado génico de p53	Control de crecimiento tumoral
Tipo silvestre	11/20 (55 %)
Mutada	13/15 (87 %)
P valor de ensayo exacto de Fisher = 0,0493	

**Los perfiles de p53 favorables y desfavorables para eficacia de Advexin® predicen el beneficio de supervivencia de Advexin® en SCCHN recurrente pero no predicen eficacia de metotrexato.** Como se representa en la FIG. 17, los análisis de biomarcadores de p53 de ensayo fundamental de T301 de fase 3 revelaron un aumento de la supervivencia estadísticamente significativo después de terapia con Advexin® para pacientes con perfiles de p53 favorables para eficacia de Advexin® en comparación con los que tenían perfiles desfavorables (mediana de la supervivencia de 7,2 frente a 2,7 meses; ensayo de rangos logarítmicos p < 0,0001).

Se obtuvieron resultados similares cuando se combinaron datos de supervivencia de biomarcadores de ensayos fundamentales T201 y T301 como se muestra en la FIG. 18. Los análisis de biomarcadores de p53 de ensayos fundamentales T301 y T201 combinados revelaron un aumento de la supervivencia estadísticamente significativo después de terapia con Advexin® para pacientes con perfiles de p53 favorables para eficacia de Advexin® en comparación con los que tenían perfiles desfavorables (mediana de la supervivencia de 8,5 frente a 2,8 meses; ensayo de rangos logarítmicos  $p = 0,0017$ ). Los hallazgos indican que estos perfiles de biomarcadores de p53 pueden predecir los pacientes que más probablemente se beneficien de la terapia de Advexin®. Estos perfiles de biomarcadores de p53 favorables y desfavorables son coherentes con los mecanismos conocidos de acción de Advexin® e inactivación de p53 tumoral descritos anteriormente.

Resulta importante que estos perfiles de biomarcadores de p53 no predijeron la eficacia de metotrexato en el ensayo T301 fundamental de fase 3 como se muestra en la FIG. 19. Estos resultados indican que los perfiles de biomarcadores de p53 predictivos de la eficacia de Advexin® no eran únicamente perfiles de pronóstico general que predecirían resultados con cualquier terapia sino que eran específicos para resultados de Advexin®. Este resultado no es sorprendente ya que estos biomarcadores predictivos se desarrollaron basándose en mecanismos conocidos de inactivación de p53 y eficacia de Advexin®.

**Implicaciones de los perfiles de biomarcadores de p53 para el control de pacientes con SCCHN recurrente con terapias de Advexin® y metotrexato.** Los resultados de estos análisis de biomarcadores de p53 tienen implicaciones importantes para el control de pacientes con SCCHN recurrente con Advexin® y metotrexato que son refractarios para cisplatino y taxanos. Como se muestra en la FIG. 20, hubo una diferencia altamente estadísticamente significativa en los resultados de supervivencia por análisis de rangos logarítmicos ( $p = 0,0003$ ) para pacientes tratados con Advexin® o metotrexato basándose en perfiles que eran favorables o desfavorables para eficacia de Advexin®.

Las medianas de supervivencia para estas poblaciones variaron de 7,2 meses para pacientes con perfiles predictivos de la eficacia de Advexin® que se trataron con Advexin® hasta solamente 2,7 meses para pacientes con perfiles desfavorables para eficacia de Advexin® que recibieron tratamiento con Advexin®. Se observaron medianas intermedias de los tiempos de supervivencia para los pacientes con perfiles favorables y desfavorables para eficacia de Advexin® que se trataron con metotrexato (4,3 y 6,0 meses respectivamente). Como se ha observado anteriormente, no hubo ninguna diferencia estadística en la mediana de supervivencia para los pacientes tratados con metotrexato basándose en perfiles de p53 predictivos de la eficacia de Advexin®.

Por lo tanto, los datos de eficacia y seguridad revisados anteriormente apoyan el uso de Advexin® para el tratamiento de pacientes con SCCHN recurrente con perfiles de p53 favorables para eficacia de Advexin® que son refractarios a cisplatino y taxanos. Los pacientes con SCCHN recurrente con respuestas de TGC después de tratamiento de Advexin® tienen aumento de la supervivencia estadísticamente significativo y se asocian perfiles de biomarcadores de p53 predictivos de la eficacia de Advexin® con respuestas de TGC con alta significación estadística. Además, los pacientes con perfiles de biomarcadores de p53 favorables para eficacia de Advexin® tienen aumento de la supervivencia estadísticamente significativo en comparación con perfiles de p53 desfavorables en respuesta a tratamiento de Advexin®. Estos biomarcadores no predicen la eficacia de metotrexato e indican que Advexin® y metotrexato proporcionan TGC y aumento de la supervivencia en subpoblaciones complementarias de SCCHN recurrente. El perfil de seguridad superior de Advexin® en comparación con metotrexato apoya adicionalmente la selección de Advexin® para el tratamiento de pacientes con SCCHN recurrente con perfiles de p53 favorables para eficacia de Advexin®.

Por el contrario, los mismos análisis de datos indican que es poco probable que los pacientes con perfiles de biomarcadores de p53 desfavorables para eficacia de Advexin® se beneficien de tratamiento de Advexin® y que deberían considerarse terapias alternativas para estos pacientes. La FIG. 21 indica que el metotrexato es eficaz en pacientes con perfiles de biomarcadores de p53 desfavorables para eficacia de Advexin® con un aumento de la supervivencia estadísticamente significativo después de metotrexato en comparación con terapia de Advexin® para pacientes con perfiles de p53 desfavorables para Advexin® (mediana de la supervivencia de 6,0 frente a 2,7 meses; ensayo de rangos logarítmicos  $p = 0,0112$ ).

Este resultado es coherente con las diferencias en los perfiles moleculares de p53 de pacientes con respuestas de TGC a Advexin® y metotrexato descritos anteriormente lo que indica que los pacientes que responden a metotrexato se asociaron con perfiles de p53 mutados y pacientes que responden a Advexin® con genotipos de p53 de tipo silvestre. En general, la respuesta tumoral, supervivencia y análisis de biomarcadores de p53 indican que tanto Advexin® como metotrexato demuestran pruebas sustanciales de eficacia en pacientes con SCCHN recurrente refractarios a cisplatino y taxanos y que el tratamiento apropiado con Advexin® o metotrexato puede orientarse por la determinación de los perfiles de biomarcadores de p53 favorables y desfavorables para eficacia de Advexin®.

## VI. Referencias

- Patente de Estados Unidos 4.415.723
- Patente de Estados Unidos 4.458.066

Patente de Estados Unidos 4.659.774  
 Patente de Estados Unidos 4.682.195  
 Patente de Estados Unidos 4.683.202  
 Patente de Estados Unidos 4.797.368  
 5 Patente de Estados Unidos 4.816.571  
 Patente de Estados Unidos 4.879.236  
 Patente de Estados Unidos 4.946.778  
 Patente de Estados Unidos 4.959.463  
 10 Patente de Estados Unidos 5.139.941  
 Patente de Estados Unidos 5.141.813  
 Patente de Estados Unidos 5.264.566  
 Patente de Estados Unidos 5.302.523  
 Patente de Estados Unidos 5.322.783  
 15 Patente de Estados Unidos 5.354.855  
 Patente de Estados Unidos 5.384.253  
 Patente de Estados Unidos 5.428.148  
 Patente de Estados Unidos 5.464.765  
 Patente de Estados Unidos 5.538.877  
 20 Patente de Estados Unidos 5.538.880  
 Patente de Estados Unidos 5.550.318  
 Patente de Estados Unidos 5.554.744  
 Patente de Estados Unidos 5.563.055  
 Patente de Estados Unidos 5.574.146  
 25 Patente de Estados Unidos 5.580.859  
 Patente de Estados Unidos 5.589.466  
 Patente de Estados Unidos 5.602.244  
 Patente de Estados Unidos 5.610.042  
 Patente de Estados Unidos 5.645.897  
 30 Patente de Estados Unidos 5.656.610  
 Patente de Estados Unidos 5.670.488  
 Patente de Estados Unidos 5.672.344  
 Patente de Estados Unidos 5.677.178  
 Patente de Estados Unidos 5.702.932  
 35 Patente de Estados Unidos 5.705.629  
 Patente de Estados Unidos 5.736.524  
 Patente de Estados Unidos 5.747.469  
 Patente de Estados Unidos 5.747.869  
 Patente de Estados Unidos 5.780.448  
 40 Patente de Estados Unidos 5.789.215  
 Patente de Estados Unidos 5.795.715  
 Patente de Estados Unidos 5.871.986  
 Patente de Estados Unidos 5.879.703  
 Patente de Estados Unidos 5.888.773  
 45 Patente de Estados Unidos 5.889.136  
 Patente de Estados Unidos 5.932.210  
 Patente de Estados Unidos 5.945.100  
 Patente de Estados Unidos 5.981.225  
 Patente de Estados Unidos 5.981.274  
 50 Patente de Estados Unidos 5.994.136  
 Patente de Estados Unidos 5.994.624  
 Patente de Estados Unidos 6.013.516  
 Patente de Estados Unidos 6.017.524  
 Patente de Estados Unidos 6.069.134  
 55 Patente de Estados Unidos 6.136.594  
 Patente de Estados Unidos 6.143.290  
 Patente de Estados Unidos 6.210.939  
 Patente de Estados Unidos 6.296.845  
 Patente de Estados Unidos 6.410.010  
 60 Patente de Estados Unidos 6.511.184  
 Patente de Estados Unidos 6.511.847  
 Patente de Estados Unidos 6.555.376  
 Patente de Estados Unidos 6.627.190  
 Patente de Estados Unidos 6.797.704  
 65 Solicitud de patente de Estados Unidos 2005/0171045  
 Solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0213764  
 Solicitud de patente de Estados Unidos 2002/0077313

- Solicitud de patente de Estados Unidos 2002/0028785  
 Solicitud de patente de Estados Unidos 2002/0006914  
 Solicitud de patente de Estados Unidos 20050143336  
 Solicitud de patente de Estados Unidos 20050196343  
 5 Solicitud de patente de Estados Unidos 20050203047  
 Solicitud de patente de Estados Unidos 20050260276  
 Solicitud de Estados Unidos n.º de serie 09/351.778  
 Ahomadegbe *et al.*, *Oncogene*, 10(6): 1217-1227, 1995.  
 Aksentijevich *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 7(9): 1111-1122, 1996.  
 10 Argiris *et al.*, *Cancer*, 101(10):2222-2229, 2004.  
 Ausubel *et al.*, en: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, Nueva York, 1996.  
 Baichwal y Sugden, en: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 117-148, 1986.  
 Bakhshi *et al.*, *Cell*, 41(3):899-906, 1985.  
 Bargonetti *et al.*, *Cell*, 65(6): 1083-1091, 1991.  
 15 Batterson y Roizman, *J. Virol.*, 46(2): 371-377, 1983.  
 Bernstein *et al.*, *Nature*, 409: 363-366, 2001.  
 Bittner *et al.*, *Methods in Enzymol.*, 153: 516-544, 1987.  
 Blomer *et al.*, *J. Virol.*, 71 (9): 6641-6649, 1997.  
 Boshier y Labouesse, *Nat. Cell. Biol.*, 2: E31-E36, 2000.  
 20 Brennecke *et al.*, *Cell*, 113: 25-36, 2003.  
 Cancer: Principles and Practice of Oncology (7ª Ed.), 2004.  
 Cancer: Principles and Practice of Oncology Single Volume (CD-ROM), Devita *et al.* (Eds.), Lippencott, 2001.  
 Cariello, *Human Genetics*, 42: 726, 1988.  
 Casey *et al.*, *Oncogene*, 6(10): 1791-1797, 1991.  
 25 Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8): 2745-2752, 1987.  
 Clayman *et al.*, *Cancer Res.*, 55(14): 1-6, 1995.  
 Clayman *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 5(7): 1715-1722, 1999.  
 Clayman *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 16(6): 2221-2232, 1998.  
 Cleary y Sklar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (21): 7439-7443, 1985.  
 30 Cleary *et al.*, *J. Exp. Med.*, 164(1): 315-320, 1986.  
 Clinical Oncology (3rd Ed.), Martin (Eds.), 2004.  
 Cook *et al.*, *Cell*, 27: 487-496, 1981.  
 Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4397, 1988.  
 Couch *et al.*, *Am. Rev. Resp. Dis.*, 88: 394-403, 1963.  
 35 Dameron *et al.* *Science* 265: 1582-1584, 1994.  
 De Vries *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*. 99(5): 2948-53, 2002.  
 DeLuca *et al.*, *J. Virol.*, 56(2): 558-570, 1985.  
 Doench *et al.*, *Genes Dev.*, 17: 438-442, 2003.  
 Edelman y Nemunaitis, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 5(6): 611-617, 2001  
 40 Elbashir *et al.*, *EMBOJ.*, 20: 6877-6888, 2001.  
 Elbashir *et al.*, *Genes Dev.*, 5(2): 188-200, 2001.  
 Elroy-Stein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(16): 6126-6130, 1989  
 Documento EP 266 032  
 Etiqueta de producto de Estados Unidos Erbitux®, 2007  
 45 Fechheimer, *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8463-8467, 1987.  
 Feigner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(21): 7413-7417, 1987.  
 Fields y Jang, *Science*, 249(4972): 1046-1049, 1990.  
 Fire *et al.*, *Nature*, 391 (6669): 806-811, 1998.  
 Fitzgibbon *et al.*, *Leukemia*, 21(7): 1514-20, 2007.  
 50 Flotho *et al.*, *Oncogene*, 26(39): 5816-21, 2007.  
 Forster y Symons, *Cell*, 49(2): 211-220, 1987.  
 Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3348-3352, 1979.  
 Froehler *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 14(13): 5399-5407, 1986.  
 Gabizon *et al.*, *Cancer Res.*, 50(19): 6371 -6378, 1990.  
 55 Gallo *et al.*, *Cancer*, 75(8): 2037-2044, 1995.  
 Ganly *et al.*, *Br. J. Cancer*, 82(2): 392-398, 2000.  
 Geisler *et al.*, *Clinical Cancer Research*, 8: 3445-3453, 2002.  
 George *et al.*, *J. Clinical Oncology*, 25(34): 5352-5358, 2007.  
 George *et al.*, *PLoS ONE*, 2(2): e255, 2007.  
 60 Gerlach *et al.*, *Nature* (Londres), 328: 802-805, 1987.  
 Ghosh y Bachhawat, en: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*,  
 Wu *et al.* (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.  
 Glorioso *et al.*, *Mol. Biotechnol.*, 4(1): 87-99, 1995.  
 Gomez-Foix *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267: 25129-25134, 1992.  
 65 Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5: 1188-1190, 1985.  
 Graham y Prevec, *Biotechnology*, 20: 363-390, 1992.

- Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52: 456-467, 1973.  
 Graham *et al.*, *J. General Virology*, 36: 59-74, 1977.  
 Grishok *et al.*, *Cell*, 106: 23-34, 2001.  
 Grishok *et al.*, *Science*, 287: 2494-2497, 2000.  
 5 Grunhaus y Horwitz, *Seminar in Virology*, 3:237-252, 1992.  
 Harland y Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3): 1094-1099, 1985.  
 Hartwell y Kastan, *Science*, 266(5192): 1821-1828, 1994.  
 Herz y Gerard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2812-2816, 1993.  
 Herz y Roizman, *Cell*, 33(1): 145-151, 1983.  
 10 Holland y Holland, *J Biol Chem*, 255(6): 2596-605, 1980.  
 Hollstein *et al.*, *Science*, 253(5015): 49-53, 1991.  
 Honess y Roizman, *J. Virol.*, 14(1): 8-19, 1974.  
 Honess y Roizman, *J. Virol.*, 16(5): 1308-1326, 1975.  
 Hutvagner y Zamore, *Science*, 297: 2056-2060, 2002.  
 15 Hutvagner *et al.*, *Science*, 293: 834-838, 2001.  
 Joyce, *Nature*, 338: 217-244, 1989.  
 Kaeppeler *et al.*, *Plant Cell Reports*, 9: 415-418, 1990.  
 Kaneda *et al.*, *Science*, 243: 375-378, 1989.  
 Kastan *et al.*, *Cancer Metastasis Rev.*, 14(1): 3-15, 1995.  
 20 Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266: 3361-3364, 1991.  
 Kawamata *et al.*, *Blood*, 111(2): 776-84, 2008.  
 Kerr *et al.*, *Br. J. Cancer*, 26(4): 239-257, 1972.  
 Ketting *et al.*, *Genes Dev.*, 15(20): 2654-2659, 2001.  
 Ketting *et al.*, *Cell*, 99(2): 133-141, 1999.  
 25 Kim y Cook, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(24): 8788-8792, 1987.  
 Knight y Bass, *Science*, 293: 2269-2271, 2001.  
 Kyzas *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 97(14): 1043-1055, 2005.  
 Ladner *et al.*, *Cancer Res.* 60: 3493-503, 2000.  
 Lai *et al.*, *Genes, Chromosomes, Cancer*, 46: 532-542, 2007.  
 30 Lara *et al.*, *Journal of Clinical Oncology*, 26: 463-467, 2008.  
 Laughlin *et al.*, *J. Virol.*, 60(2): 515-524, 1986.  
 Le Gal La Salle *et al.*, *Science*, 259: 988-990, 1993.  
 Lebkowski *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8(10): 3988-3996, 1988.  
 Lee *et al.*, *Cell*, 75: 843-854, 1993.  
 35 Levrero *et al.*, *Gene*, 101: 195-202, 1991.  
 Lin y Avery, *Nature*, 402: 128-129, 1999.  
 Lindbjerg *et al.*, *Carcinogenesis*, 28(1): 38-48, 2007.  
 Lips *et al.*, *Cancer Res.*, 65(22): 10188-10191, 2005.  
 Mann *et al.*, *Cell*, 33: 153-159, 1983.  
 40 Martin *et al.*, *Nature*, 345(6277): 739-743, 1990.  
 Matsumura *et al.*, *Oncology*, 53(4): 308-312, 1996.  
 McKaig *et al.*, *Head Neck*, 20(3): 250-265, 1998.  
 McLaughlin *et al.*, *J. Virol.*, 62(6): 1963-1973, 1988.  
 McPake *et al.*, *Cancer Res.*, 59: 4247-4251, 1999  
 45 Melcher *et al.*, *Cytogenet Genome Res.*, 118(2-4): 214-21, 2007.  
 Mercer, *Critic. Rev. Eukar. Gene Express.* 2: 251-263, 1992.  
 Meyers *et al.*, *Science*, 230: 1242, 1985.  
 Michel y Westhof, *J. Mol. Biol.*, 216: 585-610, 1990.  
 Mietz *et al.*, *EMBOJ.*, 11 (13): 5013-5020, 1992.  
 50 Miller *et al.*, *Am. J. Clin. Oncol.*, 15(3): 216-221, 1992.  
 Montgomery *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 15502-15507, 1998.  
 Mourelatos *et al.*, *Genes. Dev.*, 16: 720-728, 2002.  
 Mulder *et al.*, *Br. J. Cancer*, 71(6): 1257-1262, 1995.  
 Muzyczka, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 158: 97-129, 1992.  
 55 Nabel *et al.*, *Science*, 244(4910): 1342-1344, 1989.  
 Naldini *et al.*, *Science*, 272(5259): 263-267, 1996.  
 Nemunaitis *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 18(3): 609-622, 2000.  
 Nemunaitis *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 324(25): 1773-1778, 1991.  
 Nicolas y Rubenstein, en: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez y Denhardt  
 60 (Eds.), Stoneham: Butterworth, 494-513, 1988.  
 Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721: 185-190, 1982.  
 Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149: 157-176, 1987.  
 Olivier *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 12(4): 1157-1167, 2006.  
 Paskind *et al.*, *Virology*, 67: 242-248, 1975.  
 65 Solicitud de PCT WO 00/44914  
 Solicitud de PCT WO 01/36646

- Solicitud de PCT WO 01/68836  
 Solicitud de PCT WO 02/08436  
 Solicitud de PCT WO 02/31168  
 Solicitud de PCT WO 02/85287  
 5 Solicitud de PCT WO 03/33029  
 Solicitud de PCT WO 94/09699  
 Solicitud de PCT WO 95/06128  
 Solicitud de PCT WO 98/07408  
 Solicitud de PCT WO 99/18933  
 10 Solicitud de PCT WO 99/32619  
 Peitjean *et al.*, *Oncogene*, 26: 2157-2165, 2007.  
 Peng, *Hum. Gene Ther.*, 16(9): 1016-1027, 2005.  
 Philip *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 268(22): 16087-16090, 1993.  
 Pivot *et al.*, *Oncology*, 61(3): 197-204, 2001.  
 15 Poeta *et al.*, *NE J. Medicine*, 357(25): 2552-2561, 2007.  
 Post *et al.*, *Cell*, 24(2): 555-65, 1981.  
 Potter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 7161-7165, 1984.  
 Purdie *et al.*, *Genes Chromosomes Cancer*, 46(7): 661-9, 2007.  
 Racher *et al.*, *Biotechnology Techniques*, 9: 169-174, 1995.  
 20 Ragot *et al.*, *Nature*, 361: 647-650, 1993.  
 Recondo *et al.*, *Laryngoscope*, 101 (5): 494-501, 1991.  
 Reinhart *et al.*, *Nature*, 403: 901-906, 2000.  
 Reinhold-Hurek y Shub, *Nature*, 357: 173-176, 1992.  
 Renan, *Radiother. Oncol.*, 19: 197-218, 1990.  
 25 Resnick e Inga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(17): 9934-9939, 2003.  
 Rich *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 4: 461-476, 1993.  
 Ridgeway, en: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez y Denhardt (Eds.),  
 Stoneham: Butterworth, 467-492, 1988.  
 Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10: 689-695, 1990.  
 30 Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252: 431-434, 1991.  
 Rosenfeld, *et al.*, *Cell*, 68: 143-155, 1992.  
 Ross, *et al.*, 1: *Clin. Cancer Res.*, 13(16): 4777-85, 2007.  
 Roth *et al.*, *Nat Med.*, 2(9): 985-991, 1996.  
 Roux *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 9079-9083, 1989.  
 35 Saiki *et al.*, *Science*, 239: 487, 1988.  
 Sambrook *et al.*, en: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.  
 Sarkis *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 13(6): 1384-1390, 1995.  
 Sarver *et al.*, *Science*, 247: 1222-1225, 1990.  
 Sauter *et al.*, *J. Surg. Oncol.*, 58(4): 269-273, 1995.  
 40 Saxena *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 278: 44312-44319, 2003.  
 Scanlon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 10591-10595, 1991.  
 Sharp y Zamore, *Science*, 287: 2431-2433, 2000.  
 Sharp, *Genes Dev.*, 13: 139-141, 1999.  
 Shaw *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(10): 4495-4499, 1992.  
 45 Shenk *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:989, 1975.  
 Smith y Moss, *Gene*, 25(1): 21-28, 1983.  
 Solodin *et al.*, *Biochemistry*, 34(41): 13537-13544, 1995.  
 Souissi *et al.*, *Nat. Rev. Cancer*, 6: 83-90, 2006.  
 Stenmark-Askmalin *et al.*, *Br. J. Cancer*, 72(3): 715-719, 1995.  
 50 Stratford-Perricaudet y Perricaudet, en: *Human Gene Transfer*, Eds, Cohen-Haguenaer and Boiron, John Libbey  
 Eurotext, Francia, 51-61, 1991.  
 Stratford-Perricaudet *et al.*, *Hum. Gene. Ther.*, 1: 241-256, 1990.  
 Swisher *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 91(9): 763-771, 1999.  
 Tabara *et al.*, *Cell*, 99(2): 123-132, 1999.  
 55 Etiqueta de producto de Estados Unidos Tarceva®  
 Temin, en: *Gene Transfer*, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.  
 Templeton *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 15(7): 647-652, 1997.  
 Thierry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(21): 9742-9746, 1995.  
 Top *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 124: 155-160, 1971.  
 60 Tratschin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 4: 2072-2081, 1984.  
 Trkova *et al.*, *Cancer Gene. Cytogen.*, 145: 60-64, 2003.  
 Tsujimoto y Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(14): 5214-5218, 1986.  
 Tsujimoto *et al.*, *Science*, 228(4706): 1440-1443, 1985.  
 Tsukamoto *et al.*, *Nat. Genet.*, 9(3): 243-248, 1995.  
 65 Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6: 716-718, 1986.  
 Valentin-Vega *et al.*, *Hum. Pathol.*, 38(10): 1553-1562, 2007.

- Van Beers *et al.*, *Br. J. Cancer*, 94(2), 333-337, 2006.
- Weinberg, *Science*, 254(5035): 1138-1146, 1991.
- Wilcock y Lane, *Nature*, 349(6308): 429-431, 1991.
- Wilder *et al.*, *Cancer Res.*, 59: 410-413, 1999a.
- 5 Wilder *et al.*, *Gene Therapy*, 6: 57-62, 1999b.
- Wilson *et al.*, *Science*, 244: 1344-1346, 1989.
- Wincott *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 23(14): 2677-2684, 1995.
- Winter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 7575, 1985.
- 10 Wong *et al.*, *Gene*, 10: 87-94, 1980.
- Wu y Wu, *Biochemistry*, 27: 887-892, 1988.
- Wu y Wu, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432, 1987.
- Xu *et al.*, *Curr. Biol.*, 13: 790-795, 2003.
- Yamamoto *et al.*, 1: *Am J Hum Genet.* 81(1): 114-26, 2007.
- Yang y Huang, *Gene Therapy*, 4 (9): 950-960, 1997.
- 15 Yonish-Rouach *et al.*, *Nature*, 352(6333): 345-347, 1991.
- Zakut-Houri *et al.*, *EMBO J.*, 4(5): 1251-1255, 1985.
- Zeng *et al.*, *Mol. Cell*, 9: 1327-1333, 2002.
- Zeng *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 9779-9784, 2003.
- 20 Zhang *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 6(2): 155-164, 1995.
- Zhu *et al.*, *Science*, 261(5118): 209-211, 1993.
- Zufferey *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 15(9): 871-875, 1997.
- Menander *et al.*, Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 48: 1-2, 2007.
- 25 St John *et al.*, *Cancer Gene Therapy*, 7(5): 749-756, 2000.

## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para predecir una respuesta favorable o insuficiente a terapia génica de p53 para un sujeto humano que tiene un tumor que comprende:
- 5
- (a) determinar si células tumorales de dicho tumor tienen un gen de p53 mutado; y
  - (b) determinar si células tumorales de dicho tumor expresan una proteína p53 a un nivel que es mayor que el expresado en células no tumorales que expresan p53 normal;
- 10
- (i) en el que si se encuentra que dichas células tumorales expresan una proteína p53 mutante a niveles mayores que el expresado por células normales que expresan p53 normal, en el que la mutación en el gen de p53 es una mutación negativa dominante de bloqueo y en el que dicha p53 mutada es capaz de unirse con e inactivar proteína p53 normal, entonces esto es indicativo de una respuesta insuficiente a dicha terapia y
  - 15
  - (ii) en el que si se descubre que dichas células tumorales expresan una proteína p53 mutante a niveles mayores que el expresado por células normales que expresan p53 normal y en el que la proteína 53 mutante no se une con ni inactiva proteína p53 normal, entonces esto es indicativo de una respuesta favorable a dicha terapia; y
  - (iii) en el que si se descubre que dichas células tumorales no expresan una proteína p53 mutante a niveles que son mayores que el expresado por células normales que expresan p53 normal, entonces esto es
  - 20
  - indicativo de una respuesta favorable a dicha terapia.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) comprende un ELISA, un inmunoensayo, un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo inmunoradiométrico, un fluoroinmunoensayo, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo bioluminiscente, una electroforesis en gel, un análisis de transferencia de Western o un ensayo de hibridación *in situ*.
- 25
3. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (a) comprende amplificación de un transcrito de p53, hibridación *in situ*, transferencia de Northern o protección de nucleasa.
- 30
4. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (a) comprende secuenciación, matrices génicas o microplacas génicas.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el tumor es un crecimiento tumoral benigno definido adicionalmente como hiperplasia prostática benigna, leucoplaquia oral, un pólipo de colon, un crecimiento precanceroso esofágico o una lesión benigna.
- 35
6. El método de la reivindicación 1, en el que el tumor es un cáncer, definido adicionalmente como un cáncer oral, cáncer orofaríngeo, cáncer nasofaríngeo, cáncer respiratorio, cáncer urogenital, cáncer gastrointestinal, cáncer de tejido del sistema nervioso central o periférico, un cáncer endocrino o neuroendocrino, o cáncer hematopoyético, glioma, sarcoma, carcinoma, linfoma, melanoma, fibroma, meningioma, cáncer cerebral, cáncer orofaríngeo, cáncer nasofaríngeo, cáncer renal, cáncer biliar, feocromocitoma, cáncer de células de islotes pancreáticos, tumores de Li-Fraumeni, cáncer tiroideo, cáncer paratiroideo, tumores de la hipófisis, tumores de la glándula adrenal, tumores de sarcoma osteogénico, tumores neuroendocrinos de tipo I y tipo II múltiples, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer esofágico, cáncer traqueal, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer ovárico, cáncer uterino, cáncer del cuello uterino, cáncer testicular, cáncer de colon, cáncer rectal o cáncer de piel.
- 40
- 45
7. El método de la reivindicación 1, en el que la respuesta favorable a la terapia comprende reducción del tamaño o carga tumoral, bloqueo del crecimiento tumoral, reducción del dolor asociado a tumor, reducción de la patología asociada a tumor, reducción de los síntomas asociados a tumor, ausencia de progresión del tumor, aumento del intervalo sin enfermedad, aumento del tiempo hasta la progresión, inducción de remisión, reducción de metástasis o aumento de la supervivencia del paciente.
- 50
8. Uso de un kit en el método *in vitro* para predecir una respuesta insuficiente o favorable a terapia génica de p53 para un sujeto humano que tiene un tumor de la reivindicación 1, en el que dicho kit comprende:
- 55
- (a) un anticuerpo de p53 o una sonda para detectar una cantidad de proteína p53 en una muestra tumoral; y
  - (b) una pluralidad de sondas para determinar una estructura de transcrito o gen de p53.

## Mecanismos de actividad de ADVEXIN®

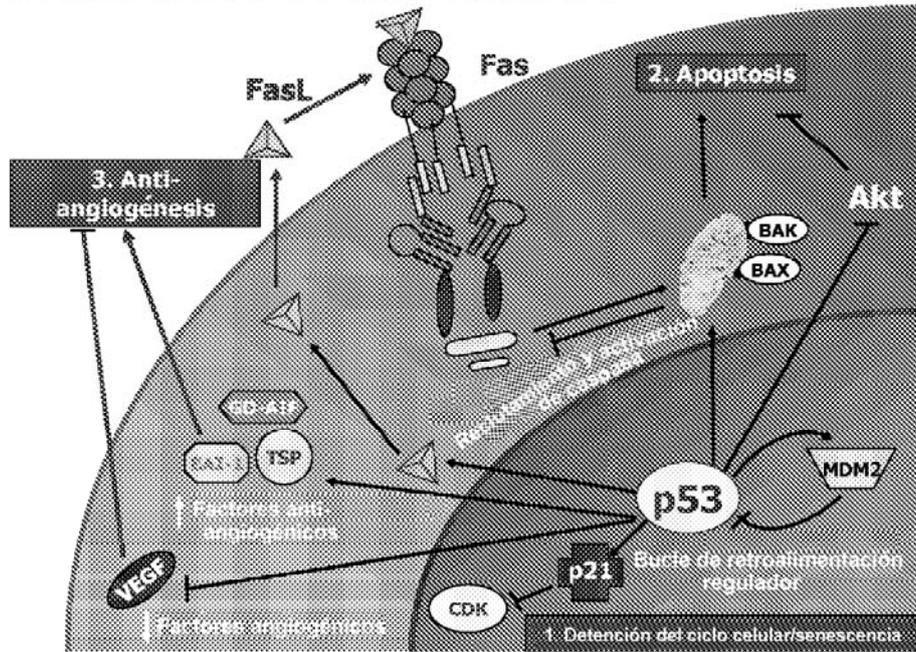


FIG. 1

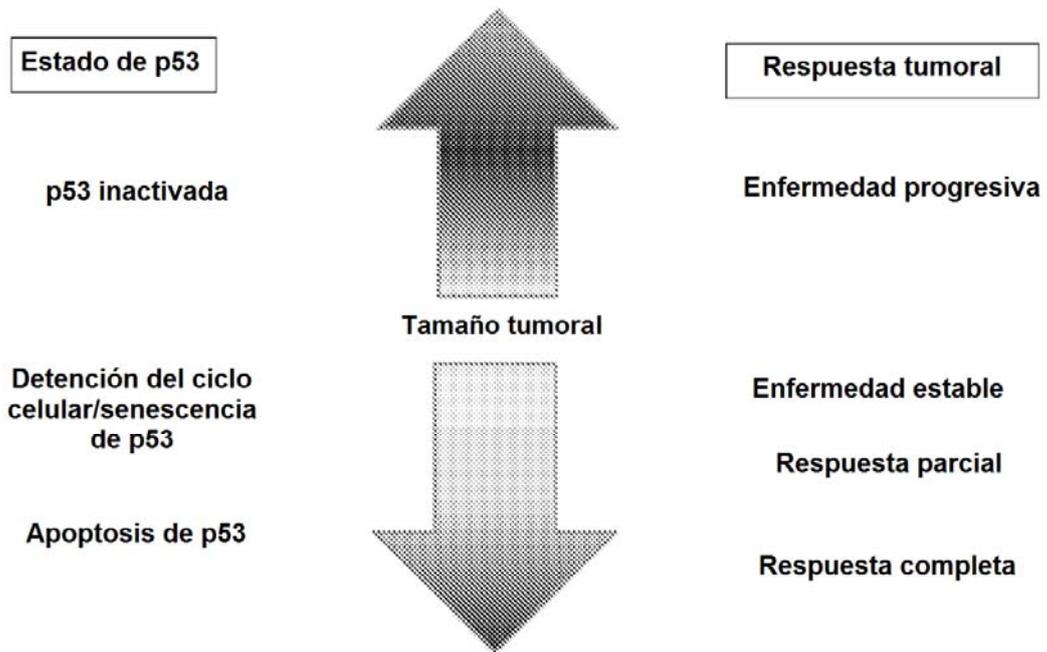


FIG. 2

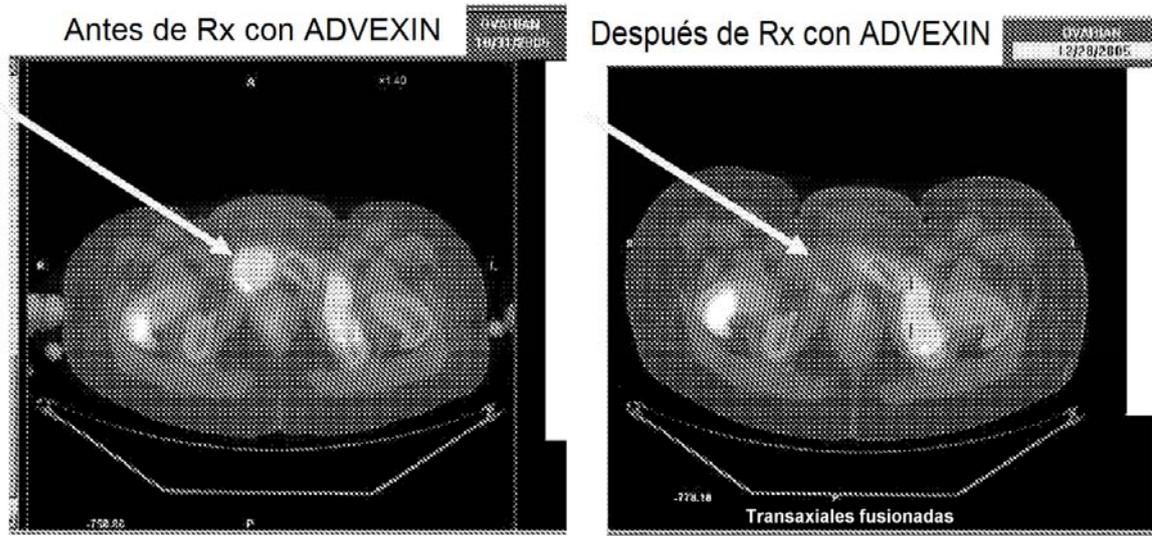


FIG. 3



Línea basal -  
Pre-ADVEXIN



CR 1 año después de Advexin



8 años después de Advexin

FIG. 4

**Correlación del Control de Crecimiento Tumoral con Aumento de la Supervivencia Después de Monoterapia de ADVEXIN® — Población ITT T301**

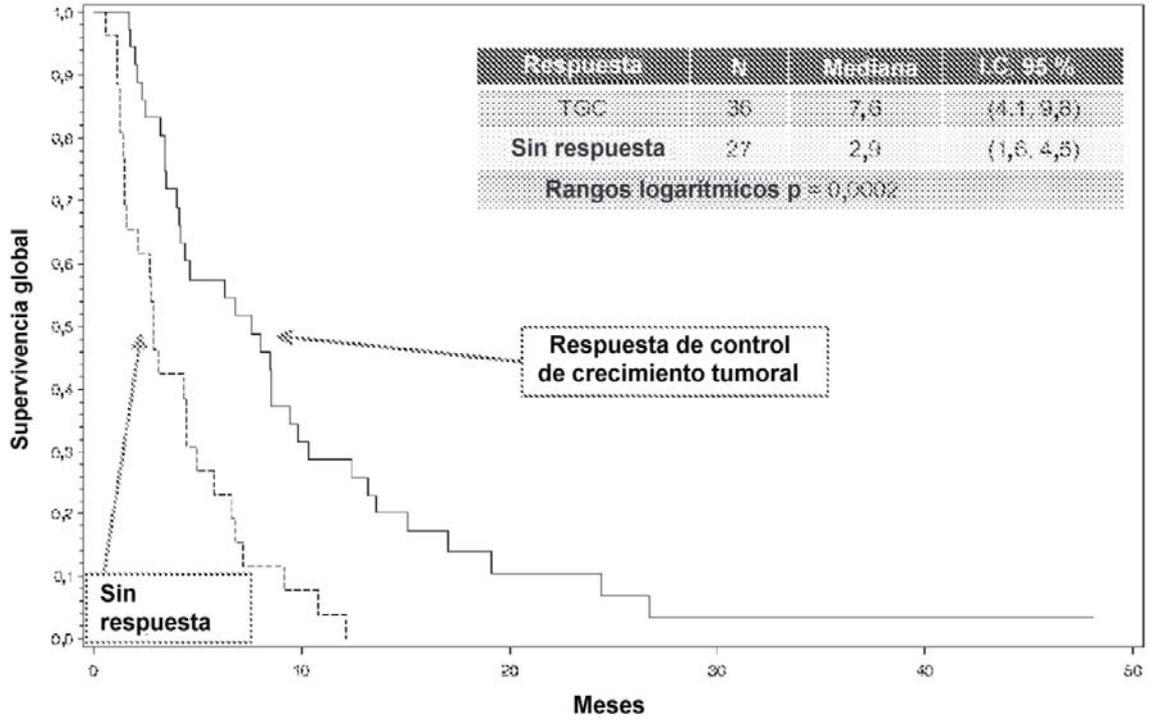


FIG. 5

**Correlación del Control de Crecimiento Tumoral con Aumento de la Supervivencia Después de Monoterapia de ADVEXIN® — Población ITT T201**

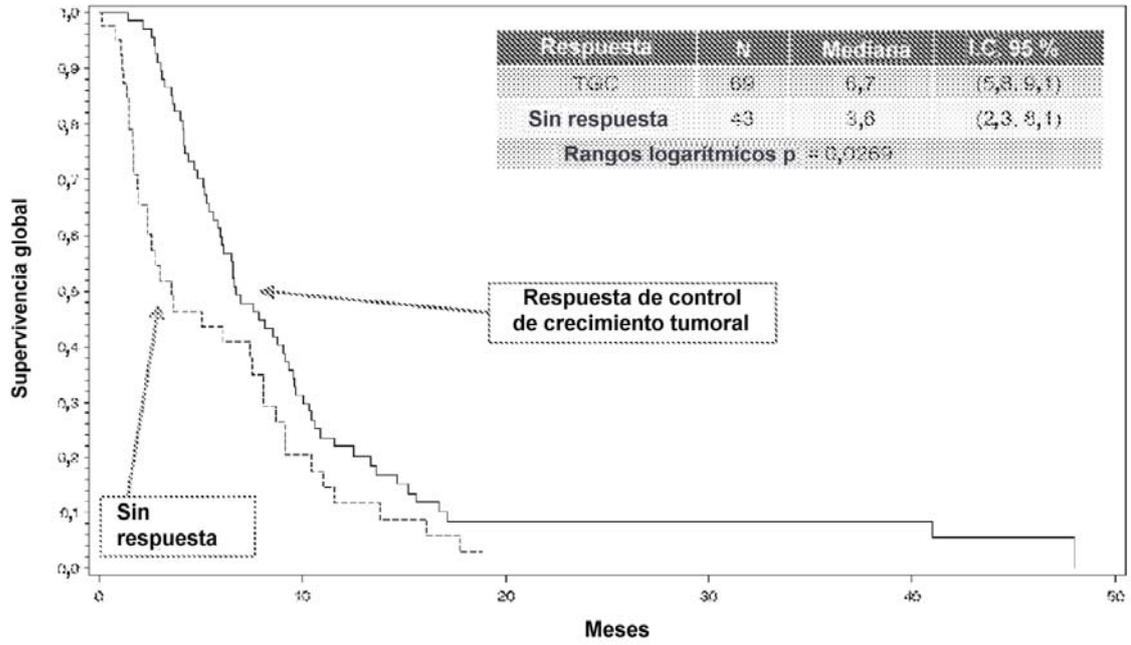


FIG. 6

**Correlación del Control de Crecimiento Tumoral con Aumento de la Supervivencia Después de Monoterapia de ADVEXIN® — Poblaciones ITT T301+T201**

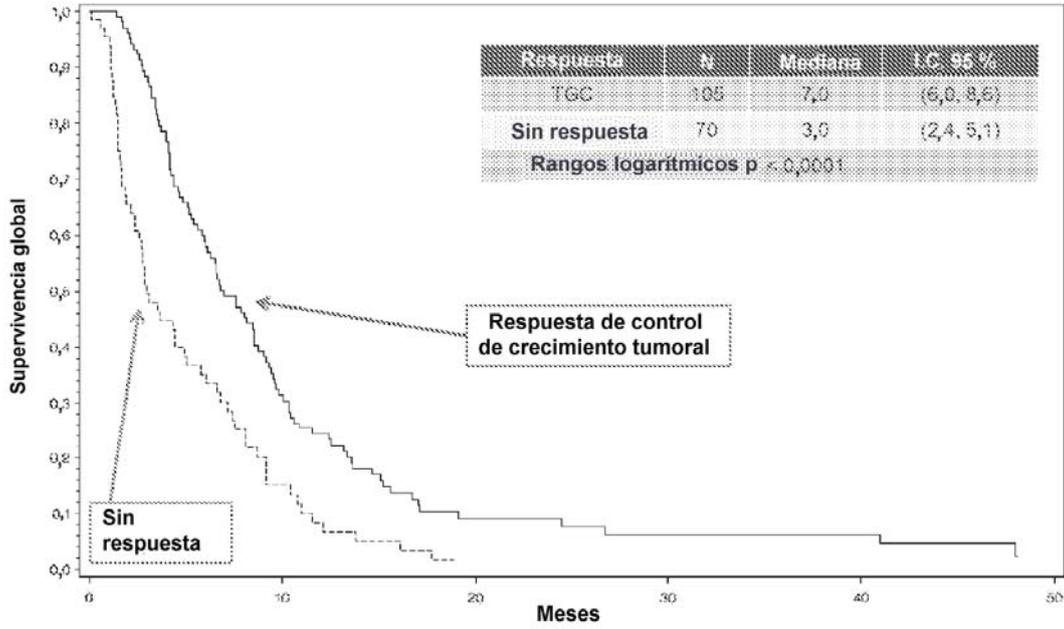


FIG. 7

**Correlación de  $\geq 10\%$  de Reducción Tumoral con Aumento de la Supervivencia Después de Monoterapia de ADVEXIN® — Poblaciones ITT T301+T201**

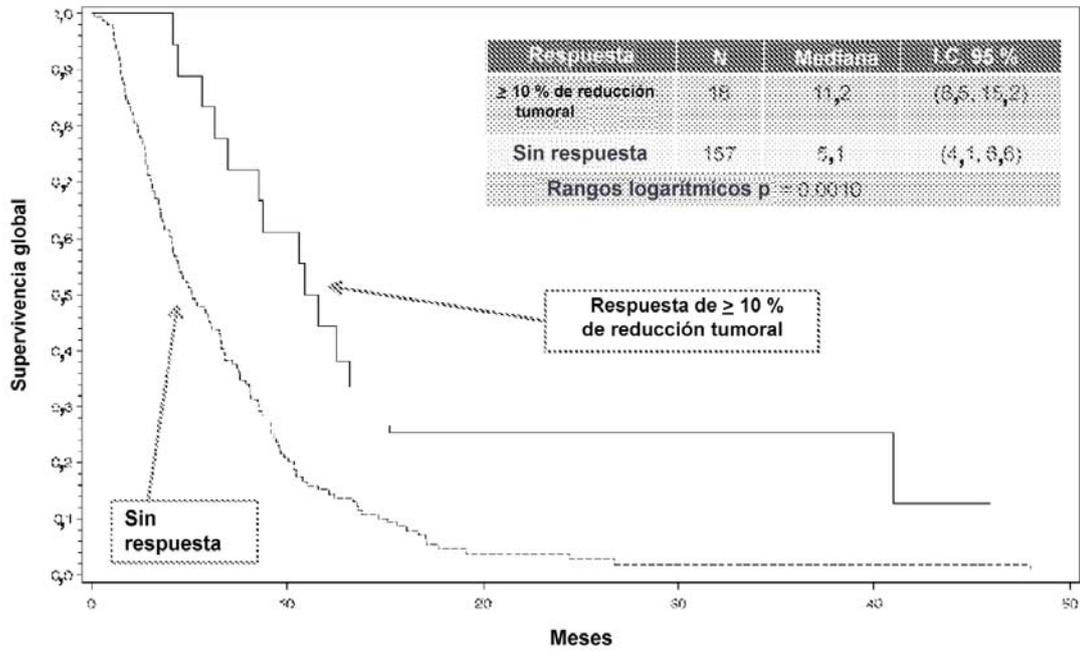


FIG. 8

**Correlación de  $\geq 50\%$  de Reducción Tumoral con Aumento de la Supervivencia Después de Monoterapia de ADVEXIN® — Poblaciones ITT T301+T201**

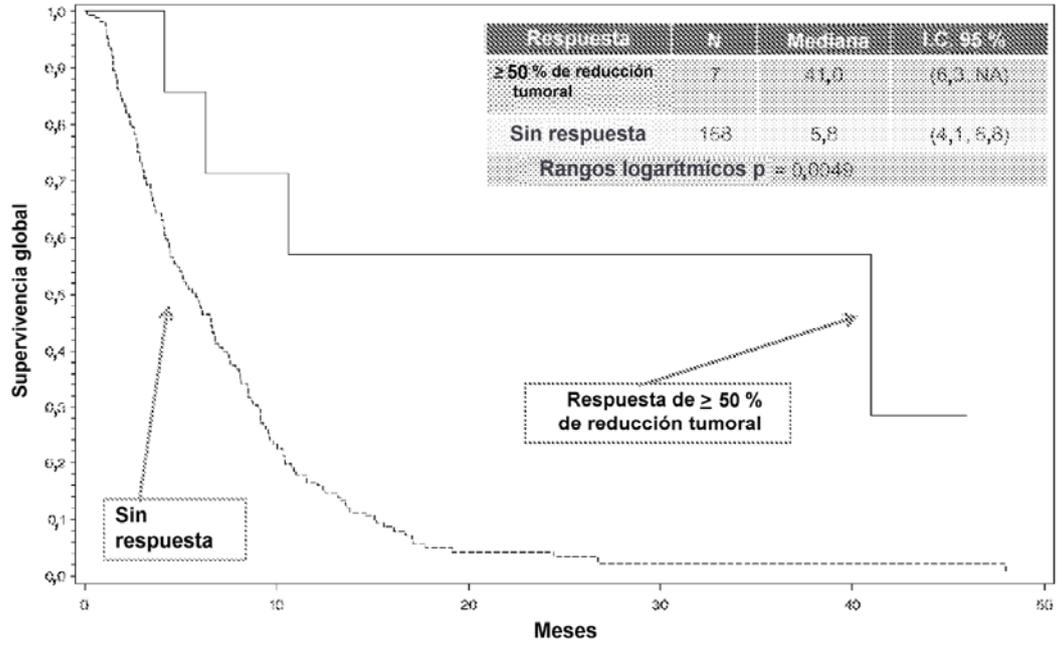


FIG. 9

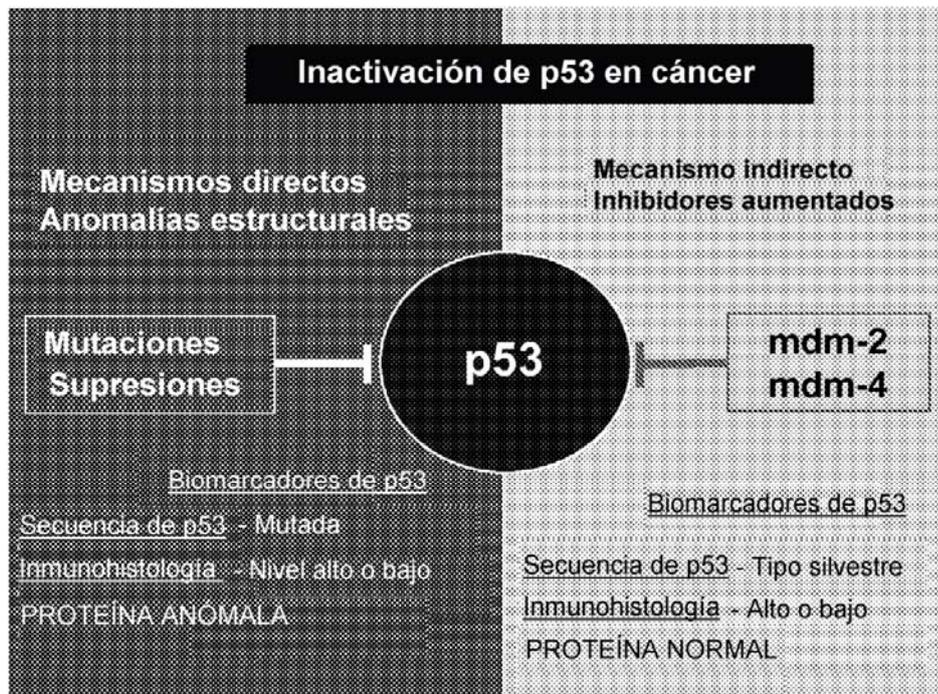


FIG. 10

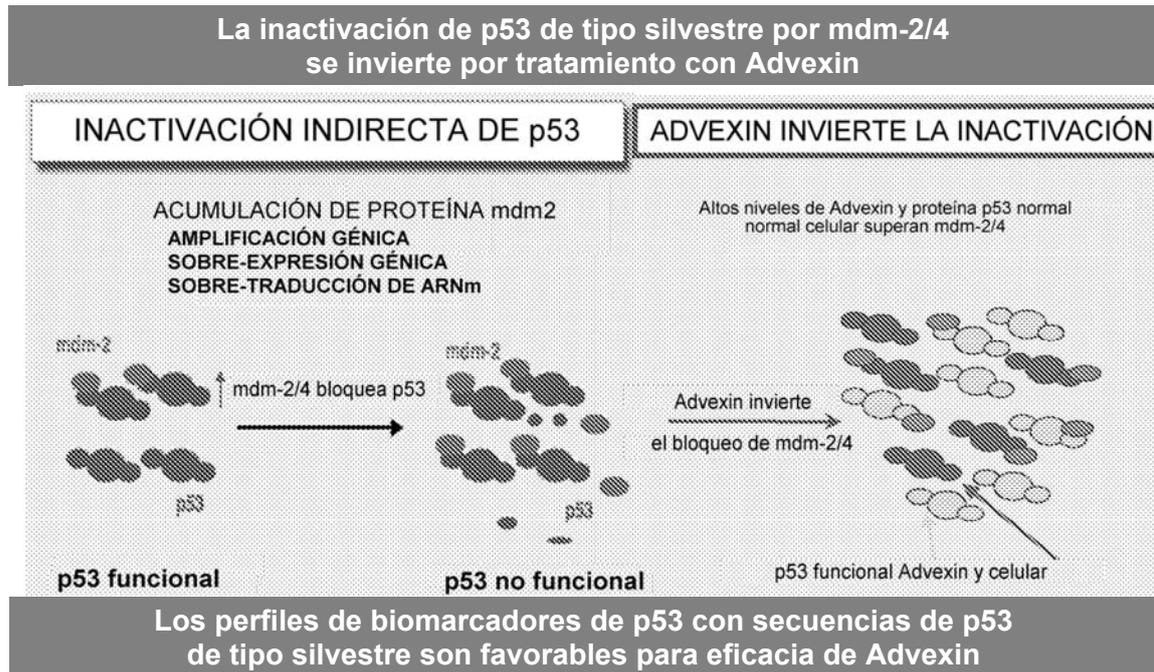


FIG. 11

**La mayoría de mutaciones de p53 están en el dominio de unión a ADN**

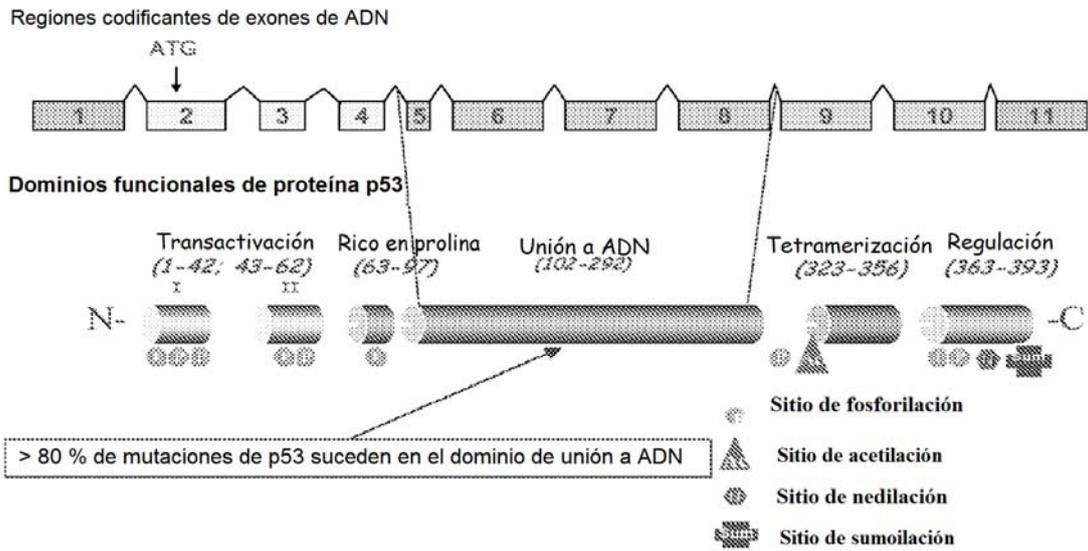


FIG. 12

Las mutaciones del dominio de unión a ADN inactivan p53 mediante la formación de tetrámeros que no se unirán con ADN

El tetrámero normal de p53 WT se une con ADN

Los tetrámeros de p53 mutantes están inactivos y no se unen con ADN

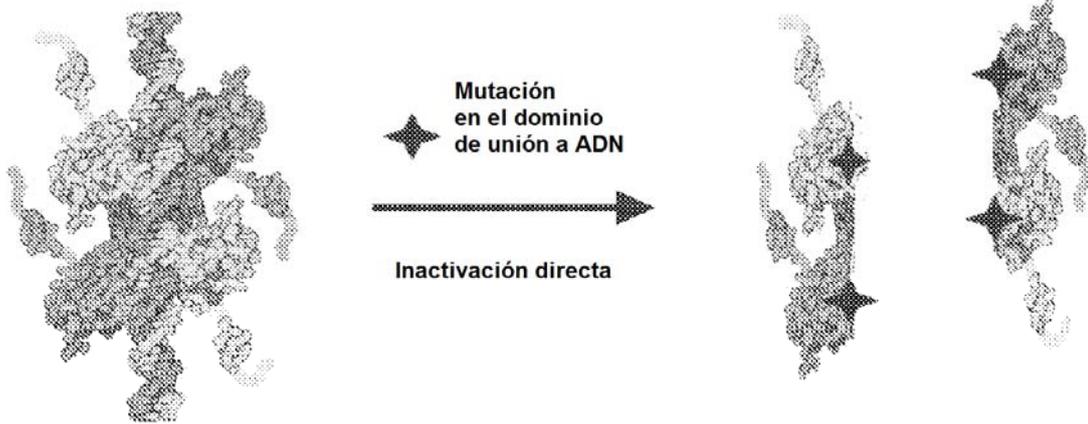


FIG. 13

El bajo nivel de expresión de p53 mutada es un perfil de biomarcadores de p53 favorable para eficacia de Advexin



FIG. 14

La expresión de p53 mutada a alto nivel es un perfil de biomarcadores de p53  
“negativo dominante” desfavorable para eficacia de Advexin

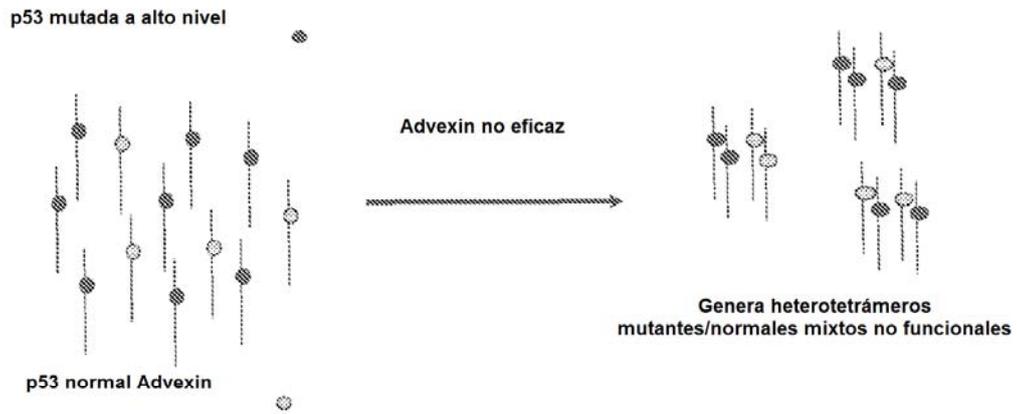


FIG. 15

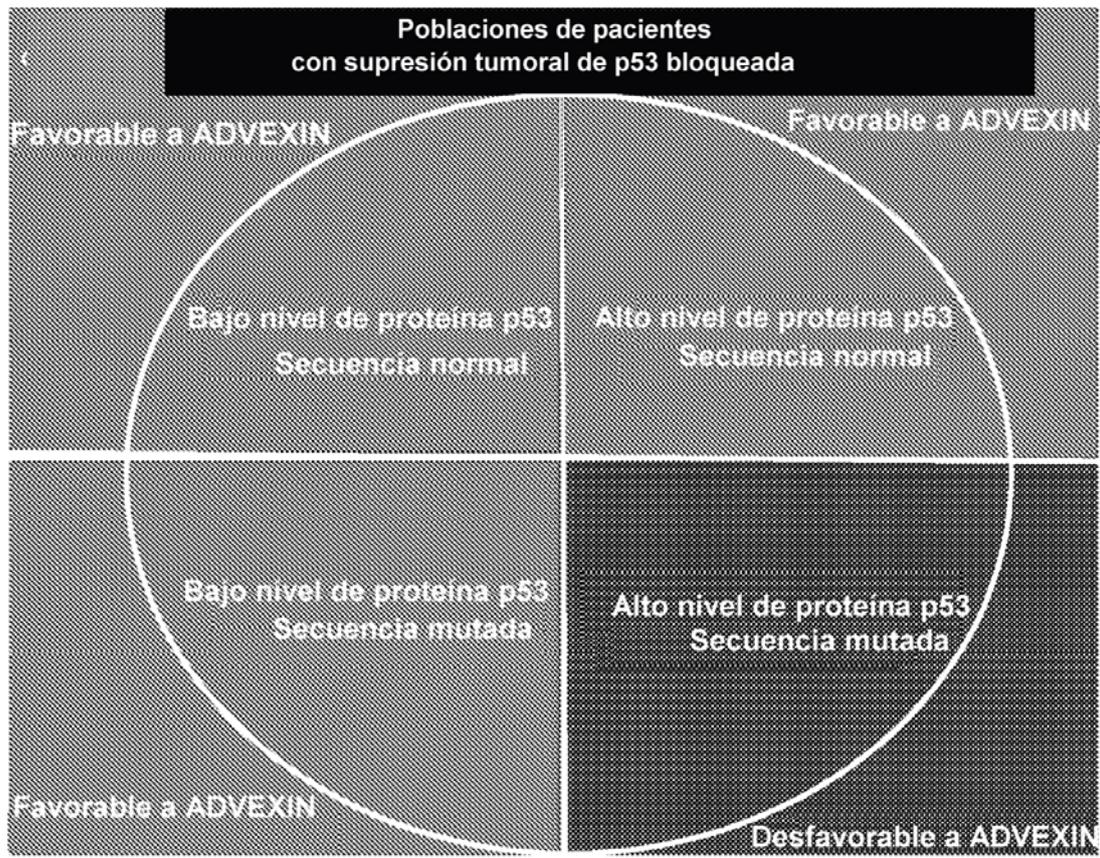
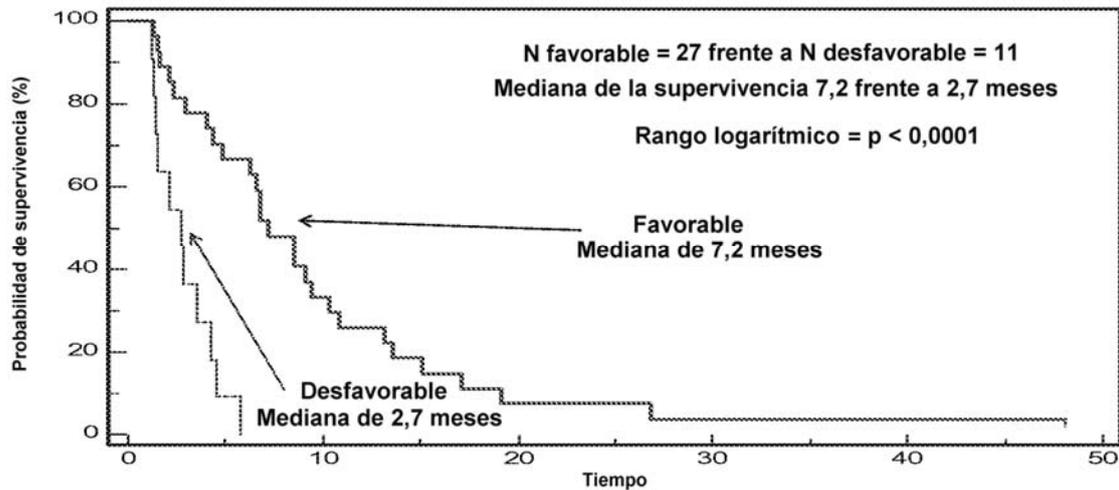


FIG. 16

**Los perfiles de p53 favorables y desfavorables para eficacia de Advexin predicen el beneficio de supervivencia de Advexin en SCCHN recurrente**

Pacientes tratados con Advexin T301 con datos de perfil de p53 informativos



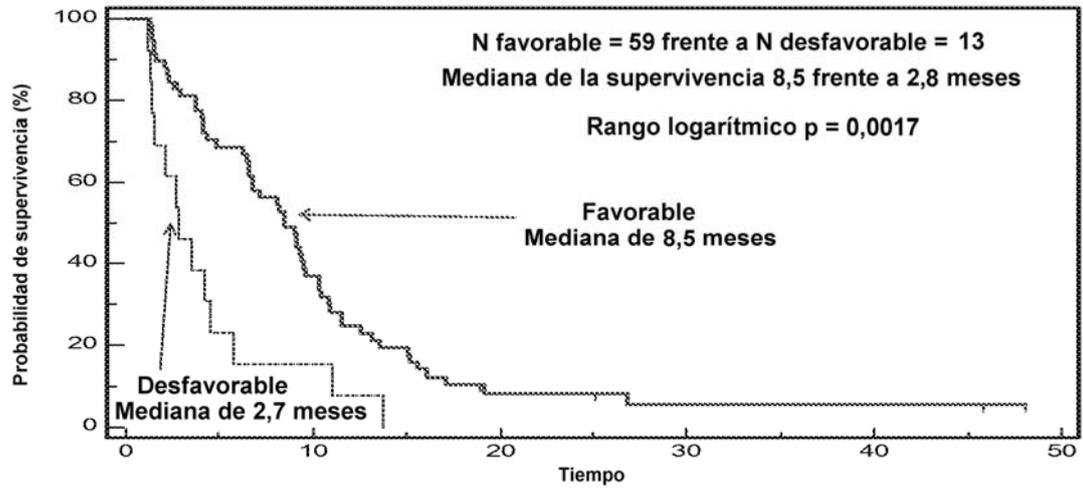
**Favorable** – Alto nivel de p53 WT; bajo nivel de p53 mutada; bajo nivel de p53 WT

**Desfavorable** – Alto nivel de p53 mutada

FIG. 17

**Los perfiles de p53 favorables y desfavorables para eficacia de Advexin predicen el beneficio de supervivencia de Advexin en SCCHN recurrente**

Pacientes tratados con Advexin T201+T301 con datos de perfil de p53 informativos

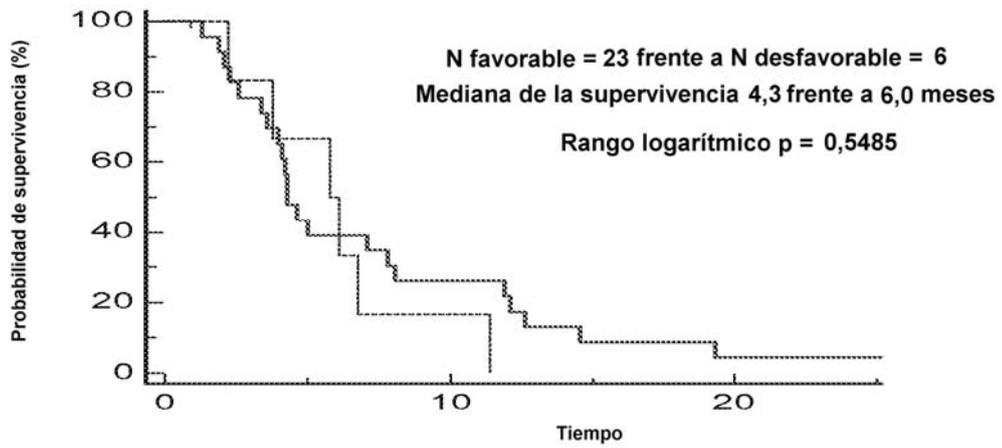


**Favorable** – Alto nivel de p53 WT; bajo nivel de p53 mutada; bajo nivel de p53 WT  
**Desfavorable** – Alto nivel de p53 mutada

FIG. 18

Los perfiles de p53 favorables y desfavorables para eficacia de Advexin no predicen el resultado de metotrexato en SCCHN recurrente

Pacientes tratados con MTX T301 con datos de perfil de p53 informativos

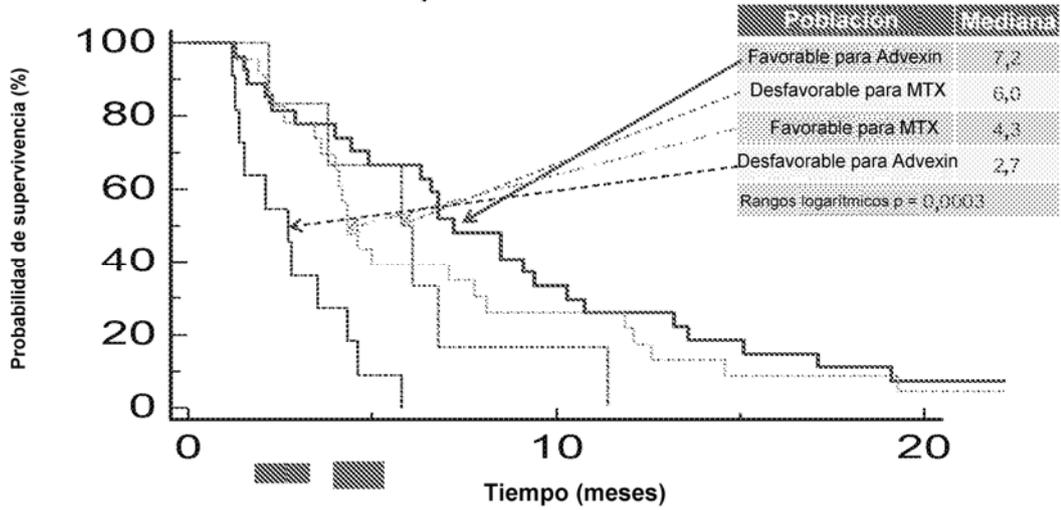


**Favorable** – Alto nivel de p53 WT; bajo nivel de p53 mutada; bajo nivel de p53 WT  
**Desfavorable** – Alto nivel de p53 mutada

FIG. 19

Los perfiles de p53 favorables y desfavorables para eficacia de Advexin predicen el beneficio de supervivencia de Advexin en SCCHN recurrente

Pacientes T301 con datos de perfil de p53 informativos

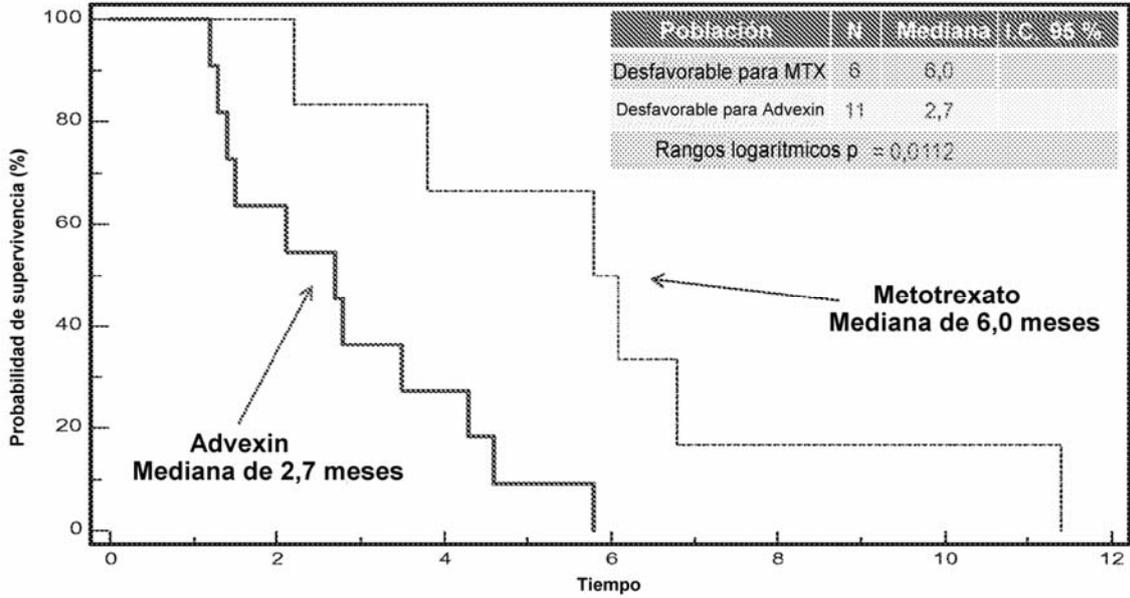


**Favorable** – Alto nivel de p53 WT; bajo nivel de p53 mutada; bajo nivel de p53 WT  
**Desfavorable** – Alto nivel de p53 mutada

FIG. 20

**El metotrexato es eficaz en pacientes con perfiles de p53 desfavorables para eficacia de Advexin en SCCHN recurrente**

Pacientes T301 con datos de perfil de p53 informativos



**Favorable** – Alto nivel de p53 WT; bajo nivel de p53 mutada; bajo nivel de p53 WT  
**Desfavorable** – Alto nivel de p53 mutada

FIG. 21