

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 899**

51 Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2011 PCT/US2011/026404**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2011 WO2011106759**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2011 E 11748220 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2539448**

54 Título: **Zimógeno de proteína C y procedimientos de utilización del mismo para prevenir las metástasis del cáncer**

30 Prioridad:

26.02.2010 US 308520 P

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

22.06.2017

73 Titular/es:

THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA (50.0%)

Abramson Pediatric Research Center Office Of Technology Transfer 3615 Civic Center Blvd Room 141

Philadelphia, PA 19104, US y

ACADEMISCH ZIEKENHUIS BIJ DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM (50.0%)

72 Inventor/es:

ARRUDA, VALDER;

HIGH, KATHERINE, A.;

VAN SLUIS, GEERTE y

SPEK, CHRISTOFFEL, ARNOLDUS

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 618 899 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

Zimógeno de proteína C y procedimientos de utilización del mismo para prevenir las metástasis del cáncer.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los campos de la medicina y la oncología. Más particularmente, la invención proporciona composiciones y procedimientos útiles para inhibir o prevenir el crecimiento y la metástasis de una diversidad de diferentes tipos de cáncer.

10

Antecedentes de la invención

La proteína C activada (PCA) es una serina proteasa anticoagulante natural que ejerce como uno de los principales moduladores del sistema de coagulación mediante el bloqueo de la amplificación de la cascada de coagulación mediante la inactivación de los factores Va y VIIIa. La ruta de la PCA se inicia mediante la formación del complejo de trombina, trombomodulina (TM) y receptor de la proteína C endotelial (RPCE), permitiendo la conversión del zimógeno de proteína C dependiente de vitamina K en su forma activada. La importancia de la PCA en la regulación de la coagulación sanguínea puede ilustrarse mediante la observación de que una deficiencia heterocigótica de proteína C se asocia a un riesgo elevado de trombosis venosa y su deficiencia homocigótica provoca púrpura fulminante, que es letal a menos que se trate con terapia de sustitución de proteína C.

15

20

25

30

35

40

Además de su actividad anticoagulante, la PCA induce efectos celulares directos que regulan la respuesta inflamatoria mediante sus propiedades de señalización celular directa. En efecto, el tratamiento con la APC reduce significativamente la mortalidad en pacientes con sepsis severa. Algunos modelos animales experimentales posteriores utilizando mutantes de PCA con actividad anticoagulante disminuida pero propiedades de señalización celular normales han revelado que el efecto protector de la PCA en la inflamación sistémica es dependiente de su actividad citoprotectora. Se ha conocido mejor la función protectora de la PCA en la enfermedad inflamatoria gracias a estudios animales que han demostrado que la PCA protege la barrera endotelial mediante la activación cruzada de la esfingosina-1-fosfato-receptor-1 (S₁P₁). Los presentes inventores han demostrado recientemente que además de la enfermedad inflamatoria, la señalización dependiente de PCA endógena también desempeña un papel clave en la metástasis experimental. En efecto, la señalización inducida por PCA endógena protegió contra la extravasación de las células de cáncer *in vivo* mediante la potenciación de la barrera endotelial vascular dependiente de cadherina-VE y mediada por la activación cruzada S₁P₁. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la administración repetida de PCA humana recombinante exógena (PCrha) redujo el número de metástasis experimentales en ratones. Estos datos sugieren que la administración de PCA podría limitar la progresión del cáncer y que podría proporcionarse una protección mejorada mediante la administración continua prolongada de PCA. Sin embargo, desde una perspectiva clínica, la administración de PCA en pacientes de cáncer podría no resultar tan sencilla como se espera. Resulta importante que la PCA presente una semivida muy corta, de aproximadamente 15 a 30 minutos y por lo tanto requiere la infusión continua para obtener efectos óptimos y la PCA se asocia con complicaciones hemorrágicas graves. Además, los niveles elevados de PCA conducen a una alteración de la barrera vascular de una manera dependiente de PAR-1 y, por lo tanto, podrían resultar en la agravación de la progresión del cáncer. De esta manera, aunque la PCA aparentemente a primera vista es una opción de tratamiento potencial para limitar la progresión del cáncer, podría no resultar clínicamente aplicable en el contexto del cáncer.

45

Sumario de la invención

Según la presente invención, se proporciona una utilización para el tratamiento o la prevención de la metástasis en un paciente de cáncer que lo necesita. Un procedimiento ejemplificativo implica la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de zimógeno de proteína C en un portador biológicamente aceptable, resultando eficaz el zimógeno de proteína C para reducir el número de focos tumorales metastásicos en dicho paciente. En un aspecto, el zimógeno de proteína C se infunde en el paciente. El zimógeno de proteína C utilizado en dicho enfoque terapéutico puede modificarse para incrementar la semivida *in vivo* de la proteína. Entre dichas modificaciones se incluyen de manera no limitativa la fusión genética con albúmina, la pegilación, la sialación y las regiones constantes (Fc) de fusión genética o fragmentos de IgG1.

55

60

65

En una forma de realización alternativa, el zimógeno de proteína C se administra en el paciente en un vector VAA que comprende ácidos nucleicos codificantes de zimógeno de proteína C, la expresión de los cuales en la célula hospedadora resulta en la producción de polipéptido zimógeno de proteína C. En una forma de realización particularmente preferida, el zimógeno de proteína C es una variante que no se encuentra activada *in vivo*, por ejemplo no requiere el receptor de señalización celular normal, PAR-1. El zimógeno de proteína C resulta eficaz para reducir la metástasis en una diversidad de sitios, incluyendo el pulmón, el hígado y el cerebro. Claramente otros tipos de cáncer con tendencia a metástasis pueden tratarse con el procedimiento dado a conocer en la presente memoria. Entre dichos cánceres se incluyen de manera no limitativa, el cáncer pancreático, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer ovárico y el cáncer esofágico. La utilización también puede implicar la administración de por lo menos un agente quimioterápico.

En todavía otro aspecto de la invención, se da a conocer un vector VAA recombinante que comprende PCA-L38D en un portador farmacéuticamente aceptable.

Descripción detallada de los dibujos

5 La figura 1 muestra una representación esquemática de los vectores víricos adenoasociados (VAA) codificantes de formas murinas o humanas de proteína C (PC) o de proteína C activada (PCA).

10 La figura 2 es una serie de gráficos que muestran la expresión de formas de PC humanas en ratones en los que se han inyectado vectores VAA PC o PCA. Se muestran las dosis de vector y el número (n) de ratones en cada grupo.

15 La figura 3 es un gráfico que representa el número de metástasis pulmonares de células de melanoma B16F10 en ratones que expresan formas murinas de PC o PCA y solución salina.

La figura 4 es un par de gráficos que representan la actividad anticoagulante de PC y PCA para tanto proteína humana como murina determinada por el tiempo de tromboplastina activada (TPTa). Este efecto se restringe únicamente a PCA de una manera dependiente de la dosis para ambas especies.

20 La figura 5 es un par de gráficos que representan la pérdida de sangre tras el corte de la cola determinada mediante la medición de la concentración de hemoglobina a DO 575 nm. El riesgo incrementado de hemorragia correlaciona con niveles elevados de PCA funcional.

25 La figura 6 es un gráfico que representa el recuento de tumores pulmonares B16F10 como función de diferentes tratamientos.

La figura 7 es un gráfico que representa que el zimógeno de proteína C también resulta eficaz para inhibir la metástasis del cáncer pulmonar en ausencia de su receptor de señalización celular principal.

30 Descripción detallada de la invención

La proteína C activada (PCA) es conocida mejor como un anticoagulante natural que también presenta propiedades citoprotectoras. Recientemente se ha demostrado que tanto la PCA endógena como exógena (PCA) pueden limitar las metástasis experimentales. Sin embargo, la PCA presenta una semivida corta (aproximadamente 15 minutos), requiere la administración intravenosa y se asocia a complicaciones hemorrágicas graves. Estas desventajas dificultan la potencial aplicación clínica de estos resultados. En contraste con la PCA, el zimógeno PC presenta una semivida más larga y se asocia a un número significativamente menor de complicaciones hemorrágicas. Los presentes inventores plantearon la hipótesis de que el zimógeno PC también podría resultar eficaz en el contexto del cáncer y que la PCA podría ser una opción de tratamiento alternativo atractiva para la PCA. Por lo tanto, los presentes inventores compararon el efecto de la sobreexpresión continua de PCA y PC con vectores víricos adenoasociados en un modelo de metástasis experimental. Resultan interesante que la sobreexpresión de PC resulte altamente eficaz en la limitación de la metástasis experimental, mientras que la sobreexpresión de la PCA no limitó la metástasis a niveles bajos (<10 ng/ml), mientras que a niveles superiores (25 a 100 ng/ml) la PCA-WT resultó protectora. Sin embargo, a estas dosis elevadas, se incrementa el riesgo de hemorragia. Una variante de la PCA (PCA-5A) sin propiedades anticoagulantes pero con propiedades de señalización normales no limitó la metástasis experimental aunque en experimentos adicionales, los presentes inventores demostraron que la PCA-L38D resultaba protectora. Este mutante se describe en Harmon S. et al. (Journal Biological Chemistry 283:30531-30539, 2008). Finalmente, el efecto de la sobreexpresión de la PC aparentemente era independiente de receptor 1 activado por proteasa, sugiriendo que el efecto se produce por las propiedades anticoagulantes de la PCA. En conclusión, el zimógeno PC presenta una utilidad en el tratamiento del cáncer para limitar la progresión del cáncer en pacientes que lo requieren.

Definiciones

55 El término "tratar" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier tipo de tratamiento que proporciona un beneficio a un paciente que sufre una enfermedad, incluyendo la mejora del estado del paciente (por ejemplo en uno o más síntomas), retrasa la progresión de la enfermedad, etc.

60 La expresión "cantidad eficaz" se refiere a aquella cantidad de agente terapéutico que resulta en una mejora del estado del paciente.

El término "administración" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la administración de un agente terapéutico en un paciente.

65 Tal como se utiliza en la presente memoria, "un medio portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes, diluyentes, otros vehículos líquidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, principios activos

- en superficie, conservantes, ligantes sólidos, lubricantes y similares, según resulte adecuado a la forma de administración particular deseada. Remingtons' Pharmaceutical Sciences, decimoquinta edición, E.W. Martin (Mack Publishing Co., Easton PA, 1975) da a conocer diversos vehículos o portadores utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Excepto en la medida en que cualquier medio portador convencional resulte incompatible con los compuestos de la invención, tal como mediante la producción de cualquier efecto biológico no deseable o que de otro modo interactúa de manera perjudicial con cualquier otro componente o componentes de la composición farmacéutica, su uso se encuentra comprendido dentro del alcance de la invención.
- En las composiciones de combinación farmacéutica de la invención, los agentes activos pueden encontrarse presentes en una cantidad de por lo menos aproximadamente 0,1% y no superior a aproximadamente 95% en peso, respecto al peso total de las composiciones, incluyendo el medio portador y el agente o agentes auxiliares. Preferentemente, la proporción de agente activo varía entre aproximadamente 1% y aproximadamente 75% en peso de la composición. Pueden utilizarse medios farmacéuticos portadores sólidos o líquidos orgánicos o inorgánicos para la administración entérica o parenteral para constituir la composición. Gelatina, lactosa, almidón, magnesio, estearato, talco, grasas y aceites vegetales y animales, goma, polialquilenglicol u otros excipientes o diluyentes conocidos para medicamentos pueden ser todos adecuados como medios portadores.
- Las composiciones indicadas en la presente memoria se formulan preferentemente en forma de unidad de administración para facilitar la administración y uniformidad de las dosis. La expresión "forma de administración unitaria" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una unidad físicamente discreta de la composición para el paciente que debe tratarse. Cada dosis debería contener la cantidad de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, sin modificación o asociado a un medio portador farmacéutico seleccionado. Las composiciones de combinación de la invención pueden administrarse oralmente, parenteralmente, mediante inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, infusión intravenosa o similar. La administración intravenosa resulta particularmente preferida. Las composiciones de la invención se administran típicamente mediante infusiones intravenosas de duración variable, resultando preferidas las infusiones de entre 1 hora y 24 horas.
- Las composiciones pueden administrarse con la frecuencia necesaria para obtener el efecto terapéutico deseado. En una forma de realización preferida de la presente invención, se administra el zimógeno de proteína C en los pacientes de cáncer en forma de una inyección intravenosa de bolo.
- Los agentes quimioterápicos son compuestos que muestran una actividad anticancerosa y/o resultan perjudiciales para una célula (por ejemplo una toxina). Entre los agentes quimioterápicos adecuados se incluyen de manera no limitativa toxinas (por ejemplo saporina, ricina, abrina, bromuro de etidio, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* y otras listadas anteriormente), agentes alquilantes (por ejemplo mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, ciclofosfamida, isofamida, mecloretamina, melfalán y mostaza uracilo; aziridinas tales como tiotepa; ésteres de metanosulfonato, tales como busulfán; nitrosoureas, tales como carmustina, lomustina y estreptozocina; complejos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; alquilantes biorreductores, tales como mitomicina, procarbazona, dacarbazina y altretamina); agentes de rotura de la cadena de ADN (por ejemplo bleomicina); inhibidores de la topoisomerasa II (por ejemplo amsacrina, dactinomomicina, daunorrubicina, idarrubicina, mitoxantrona, doxorubicina, etopósido y tenipósido); agentes de unión al surco menor del ADN (por ejemplo plicamidina); antimetabolitos (por ejemplo antagonistas del folato, tales como metotrexato y trimetrexato; antagonistas de pirimidina, tales como fluorouracilo, fluorodesoxiuridina, CB3717, azacitidina, citarabina y floxuridina; antagonistas de purina, tales como mercaptopurina, 6-tioguanina, fludarabina, pentostatina; asparinas; e inhibidores de ribonucleótido reductasa, tales como hidroxiaurea); agentes de interacción con la tubulina (por ejemplo vincristina, vinblastina y paclitaxel (Taxol)); agentes hormonales (por ejemplo estrógenos, estrógenos conjugados; etinil-estradiol; dietilestilbesterol; clortrianisén; idenestrol; progestinas, tales como caproato de hidroxiprogesterona, medroxiprogesterona y megestrol; y andrógenos, tales como testosterona, propionato de testosterona, fluoximesterona y metiltestosterona); corticoesteroides adrenales (por ejemplo prednisona, dexametasona, metilprednisolona y prednisolona); agentes liberadores de hormona luteinizante o antagonistas de hormona liberadora de gonadotropina (por ejemplo acetato de leuprolid y acetato de goserelina) y antígenos antihormonales (por ejemplo tamoxifeno, agentes antiandrógeno, tales como flutamida; y agentes antiadrenales, tales como mitotano y aminoglutetimida). En una forma de realización particular, el agente quimioterápico se selecciona de entre el grupo que consiste en: paclitaxel (Taxol®), cisplatino, docetaxol, carboplatino, vincristina, vinblastina, metotrexato, ciclofosfamida, CPT-11, 5-fluorouracilo (5-FU), gemcitabina, estramustina, carmustina, adriamicina (doxorubicina), etopósido, trióxido de arsénico, irinotecán y derivados de epotilón.
- En referencia a los ácidos nucleicos de la invención, en ocasiones se utiliza la expresión "ácido nucleico aislado". Esta expresión, aplicada al ADN, se refiere a una molécula de ADN que se separa de las secuencias que son inmediatamente contiguas a la misma (en los sentidos 5' y 3') en el genoma natural del organismo a partir del que se origina. Por ejemplo, el "ácido nucleico aislado" puede comprender una molécula de ADN o ADNc insertada en el vector, tal como un plásmido o vector vírico, o integrarse en el ADN de un procarionte o eucariota.
- Con respecto a las moléculas de ARN de la invención, la expresión "ácido nucleico aislado" se refiere principalmente a una molécula de ARN codificada por una molécula de ADN aislada tal como se ha definido anteriormente.

Alternativamente, la expresión puede referirse a una molécula de ARN que ha sido suficientemente separada de las moléculas de ARN con las que se encontraría asociada en su estado natural (es decir, en células o tejidos), de manera que existe en una forma "sustancialmente pura" (la expresión "sustancialmente pura" se define a continuación).

5 Con respecto a las proteínas, en la presente memoria en ocasiones se utiliza la expresión "proteína aislada" o "proteína aislada y purificada". Esta expresión se refiere principalmente a una proteína producida mediante la expresión de una molécula aislada de ácidos nucleicos de la invención. Alternativamente, dicha expresión puede referirse a una proteína que ha sido suficientemente separada de otras proteínas con las que se encontraría naturalmente asociada, de manera que exista en forma "sustancialmente pura".

La expresión "región promotora" se refiere a las regiones reguladoras de la transcripción de un gen que pueden encontrarse en el lado 5' o 3' de la región codificante, o dentro de la región codificante, o dentro de intrones.

15 El término "vector" se refiere a una molécula de ADN portador pequeña en la que puede insertarse una secuencia de ADN para la introducción en una célula hospedadora en la que se replicará. Un "vector de expresión" es un vector especializado que contiene una secuencia génica o de ácidos nucleicos con las regiones reguladoras necesarias que se requieren para la expresión en una célula hospedadora.

20 La expresión "ligado funcionalmente" se refiere a que las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de una secuencia codificante se introducen en la molécula de ADN en las posiciones apropiadas respecto a la secuencia codificante de manera que afecten a la expresión de la secuencia codificante. Esta misma definición en ocasiones se aplica a la disposición de las secuencias codificantes y elementos de control de la transcripción (por ejemplo promotores, intensificadores y elementos de terminación) en un vector de expresión. Esta definición en ocasiones también se aplica a la disposición de las secuencias de ácidos nucleicos de una primera y una segunda moléculas de ácidos nucleicos en las que se genera una molécula híbrida de ácidos nucleicos.

Las proteínas de fusión o proteínas quiméricas son proteínas creadas mediante la unión de dos o más genes que originalmente codificaban proteínas separadas. La traducción de dicho gen de fusión resulta en un único polipéptido con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales. Las proteínas de fusión recombinantes se crean artificialmente mediante tecnología de ADN recombinante para la utilización en investigación o terapéuticos biológicos. El zimógeno PC puede fusionarse con varios tipos diferentes de fracciones para incrementar la semivida de la proteína *in vivo*. Entre dichas modificaciones se incluyen, por ejemplo, la fusión genética con albúmina, la pegilación, la sialación y la fusión genética con regiones constantes (Fc) o fragmentos de IgG1. Dichos enfoques se describen en Schulte, *Thrombosis Research* 124:S6-S8, 2009; Peters et al. (2010) 115:2057-2064 y Mei et al. (2010) 116:270-279.

La expresión "porcentaje idéntico" se utiliza en la presente memoria en referencia a la comparación entre secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos. Las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos con frecuencia se comparan utilizando programas informáticos que alinean secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, definiendo de esta manera las diferencias entre las dos. En el contexto de la presente invención, se llevan a cabo comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos utilizando el GCG Wisconsin Package versión 9.1., disponible del Genetics Computer Group en Madison, Wisconsin. Por comodidad, los parámetros por defecto (penalización por creación de hueco=12, penalización por extensión de hueco=4) especificados por dicho programa son los utilizados en la presente memoria para comparar las identidades de secuencias. Alternativamente, puede utilizarse el programa Blastn 2.0, proporcionado por el National Center for Biotechnology Information (en Internet en ncbi.nlm.nih.gov/blast/; Altschul, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990) utilizando una alineación con huecos utilizando los parámetros por defecto, con el fin de determinar el nivel de identidad y de similitud entre secuencias de ácidos nucleicos y entre secuencias de aminoácidos.

50 II. Preparación de polipéptidos y moléculas de ácidos nucleicos codificantes de zimógeno de proteína C

A. Moléculas de ácidos nucleicos

55 Las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de moléculas de zimógeno de proteína C de la invención pueden prepararse mediante la utilización de métodos de tecnología de ADN recombinante. La disponibilidad de información de secuencia de nucleótidos permite la preparación de moléculas aisladas de ácidos nucleicos de la invención mediante una diversidad de medios. Por ejemplo, pueden aislarse secuencias de ácidos nucleicos codificantes de un polipéptido zimógeno de proteína C a partir de fuentes biológicas apropiadas utilizando protocolos estándares bien conocidos en la técnica. El nº de acceso de GenBank NM_000312 proporciona la secuencia codificante del zimógeno de proteína C. La expresión y purificación de dichas secuencias se encuentra perfectamente comprendida dentro de los conocimientos del experto en la materia. El zimógeno de proteína C variante contiene una mutación PC(R15Q) que evita la activación de la molécula. Ver Lu G., Chhum S., Krishnaswamy K. La afinidad de la proteína C para el complejo trombina-trombomodulina se determina de manera principal mediante interacciones dependientes del sitio activo (*Journal Biological Chemistry* 280:15471-15478, 2005).

Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden mantenerse como ADN en cualquier vector de clonación conveniente. En una forma de realización preferida, los clones se mantienen en un plásmido vector de clonación/expresión, tal como pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA), que se propaga en una célula hospedadora de *E. coli* adecuada. Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden mantenerse en un vector adecuado para la expresión en células de mamífero. En los casos en que la modificación postraduccional afecta a la función de la coagulación, resulta preferido expresar la molécula en células de mamífero.

Entre las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de zimógeno de proteína C de la invención se incluyen ADNc, ADN genómico, ARN y fragmentos de los mismos que pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena. De esta manera, la presente invención proporciona oligonucleótidos (cadenas de sentido o antisentido de ADN o ARN) que presentan secuencias que pueden hibridarse con por lo menos una secuencia de una molécula de ácidos nucleicos de la presente invención. Dichos oligonucleótidos resultan útiles como sondas para detectar la expresión de zimógeno de proteína C.

B. Proteínas

Puede prepararse un polipéptido zimógeno de proteína C de la presente invención de una diversidad de maneras, según métodos conocidos. La proteína puede purificarse a partir de fuentes apropiadas, por ejemplo células o tejidos en cultivo bacterianos o animales transformados que expresan zimógeno de proteína C manipulado mediante purificación mediante inmunoafinidad.

La disponibilidad de moléculas de ácidos nucleicos codificantes de un polipéptido zimógeno de proteína C permite la producción del mismo utilizando métodos de expresión *in vitro* conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede clonarse un ADNc o gen en un vector de transcripción *in vitro* apropiado, tal como pSP64 o pSP65 para la transcripción *in vitro*, seguido de la traducción sin células en un sistema de traducción sin células adecuado, tal como lisados de germen de trigo o de reticulocitos de conejo. Los sistemas de transcripción y traducción *in vitro* se encuentran comercializados, por ejemplo por Promega Biotech, Madison, Wisconsin o BRL, Rockville, Maryland.

Alternativamente, según una forma de realización preferida, pueden producirse mayores cantidades de zimógeno de proteína C mediante la expresión en un sistema de expresión procariótico o eucariótico adecuado. Por ejemplo, parte o la totalidad de una molécula de ADN codificante de zimógeno de proteína C variante por ejemplo puede insertarse en un vector plásmido adaptado para la expresión en una célula bacteriana, tal como *E. coli*, o una célula de mamífero, tal como células CHO o HeLa. Alternativamente, en una forma de realización preferida, pueden generarse proteínas de fusión etiquetadas que comprenden zimógeno de proteína C. Dichas proteínas de fusión de zimógeno de proteína C etiquetadas están codificadas por parte o la totalidad de una molécula de ADN, ligada en el marco de lectura de codones correcto con una secuencia de nucleótidos codificante de una parte o la totalidad de una etiqueta polipéptido deseada que se inserta en un vector plásmido adaptado para la expresión en una célula bacteriana, tal como *E. coli* o una célula eucariótica, tal como, aunque sin limitación, células de levadura y de mamífero. Algunos vectores tales como los indicados anteriormente comprenden los elementos reguladores necesarios para la expresión del ADN en la célula hospedadora posicionado de manera que permita la expresión del ADN en la célula hospedadora. Entre dichos elementos reguladores requeridos para la expresión se incluyen de manera no limitativa, secuencias de promotor, secuencias de inicio de transcripción y secuencias de intensificador.

Las proteínas de zimógeno de proteína C, producidas mediante la expresión génica en un sistema procariótico o eucariótico recombinante pueden purificarse según métodos conocidos en la técnica. En una forma de realización preferida, puede utilizarse un sistema de expresión/secreción disponible comercialmente, en el que la proteína recombinante se expresa y después se secreta a partir de la célula hospedadora, para la fácil purificación a partir del medio circundante. En el caso de que no se utilicen vectores de expresión/secreción, un enfoque alternativo implica purificar la proteína recombinante mediante separación por afinidad, tal como mediante interacción inmunitaria con anticuerpos que se unen específicamente a la proteína recombinante o columnas de níquel para el aislamiento de proteínas recombinantes etiquetadas con 6 a 8 residuos de histidina en sus extremos N-terminal o C-terminal. Las etiquetas alternativas pueden comprender el epítipo FLAG, GST o el epítipo hemaglutinina. Dichos métodos son utilizados comúnmente por el experto en la materia.

Las proteínas zimógeno de proteína C, preparadas mediante los métodos anteriormente indicados, pueden analizarse según procedimientos estándares. Por ejemplo, dichas proteínas pueden evaluarse para propiedades de coagulación alteradas según métodos conocidos.

Tal como se ha expuesto anteriormente, un modo conveniente de producir un polipéptido según la presente invención es expresar ácidos nucleicos codificantes del mismo, mediante la utilización de los ácidos nucleicos en un sistema de expresión. Una diversidad de sistemas de expresión de utilidad para los métodos de la presente invención es conocida por el experto en la materia.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención comprende además un procedimiento de preparación de un polipéptido (tal como se da a conocer), incluyendo el procedimiento la expresión a partir de ácidos nucleicos codificantes del polipéptido (generalmente ácidos nucleicos). Esto puede llevarse a cabo

convenientemente mediante el cultivo de una célula hospedadora, que contiene dicho vector, bajo unas condiciones apropiadas que provocan o permiten la producción del polipéptido. También pueden producirse polipéptidos en sistemas *in vitro*.

5 III. Utilizaciones de zimógenos de proteína C y ácidos nucleicos codificantes de zimógeno de proteína C

Los polipéptidos zimógenos de proteína C y los ácidos nucleicos codificantes de variantes de zimógeno de proteína C que presentan actividades alteradas pueden utilizarse según la presente invención, por ejemplo como agentes terapéuticos y/o profilácticos (proteínas o ácidos nucleicos) para el tratamiento del cáncer y/o en estrategias con células para la expresión continua de zimógeno de proteína C en pacientes de cáncer.

A. Polipéptidos zimógenos de proteína C

En una forma de realización preferida de la presente invención, pueden administrarse polipéptidos zimógenos de proteína C en un paciente mediante infusión en un portador biológicamente compatible, preferentemente mediante inyección intravenosa. Los zimógenos proteína C de la invención pueden fusionarse opcionalmente con otras fracciones proteicas o químicas que confieren estabilidad, encapsulados en liposomas o mezclados con otros fosfolípidos o micelas para incrementar la estabilidad y/o biodisponibilidad de la molécula. El zimógeno de proteína C puede administrarse solo o en combinación con otros agentes conocidos para modular el crecimiento y progresión del cáncer (por ejemplo agentes quimioterápicos, radiación, anticuerpos que inhiben o bloquean el crecimiento de las células de cáncer, etc.). Una composición apropiada en la que administrar polipéptidos zimógenos de proteína C puede ser determinada por el profesional médico tras considerar una diversidad de variables fisiológicas, entre ellas, aunque de manera no limitativa, el estado del paciente y el estadio del cáncer. Son bien conocidas en la técnica una diversidad de composiciones perfectamente adecuadas para diferentes aplicaciones y vías de administración y se mencionan a continuación en la presente memoria.

La preparación que contiene el zimógeno de proteína C purificado contiene una matriz fisiológicamente aceptable y preferentemente se formula como preparación farmacéutica. La preparación puede formularse utilizando métodos de la técnica anterior sustancialmente conocidos, puede mezclarse con un tampón que contiene sales, tales como NaCl, CaCl₂ y aminoácidos, tales como glicina y/o lisina, y en un intervalo de pH de entre 6 y 8. Hasta que se requiera, la preparación purificada que contiene el zimógeno de proteína C puede almacenarse en forma de una solución acabada o en forma liofilizada o ultracongelada. Preferentemente, la preparación se almacena en forma liofilizada y se disuelve en una solución visualmente transparente utilizando una solución de reconstitución apropiada.

Antes del procesamiento de la proteína purificada para generar una preparación farmacéutica, la proteína purificada se somete a los controles de calidad convencionales y se prepara en una forma terapéutica de presentación. En particular, durante la preparación recombinante, la preparación purificada se somete a ensayo para la ausencia de ácidos nucleicos celulares, así como ácidos nucleicos que se derivan del vector de expresión, preferentemente utilizando un método tal como se indica en el documento EP 0 714 987.

B. Ácidos nucleicos codificantes de zimógeno de proteína C

Los ácidos nucleicos codificantes de zimógeno de proteína C pueden utilizarse para una diversidad de fines según la presente invención. En una forma de realización preferida de la invención, se proporciona un vehículo de administración de ácidos nucleicos (es decir, un vector de expresión) para modular la metástasis tumoral, en el que el vector de expresión comprende una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido zimógeno de proteína C, o un fragmento funcional del mismo tal como se indica en la presente memoria. La administración de vectores de expresión codificantes de zimógeno de proteína C en un paciente resulta en la expresión de polipéptido zimógeno de proteína C, que sirve para inhibir el crecimiento metastásico. Según la presente invención, una secuencia de ácidos nucleicos codificante de zimógeno de proteína C codifica un polipéptido zimógeno de proteína C tal como se indica en la presente memoria cuya expresión reduce las metástasis. En una forma de realización preferida, una secuencia de ácidos nucleicos de zimógeno de proteína C codifica una variante de zimógeno de proteína C humana que no puede ser activada.

Los vectores de expresión que comprenden secuencias de ácidos nucleicos de zimógeno de proteína C pueden administrarse solos o en combinación con otras moléculas útiles para el tratamiento del cáncer. Según la presente invención, los vectores de expresión o combinación de agentes terapéuticos pueden administrarse en el paciente solos o en una composición farmacéuticamente aceptable o biológicamente aceptable.

En una forma de realización preferida de la invención, el vector de expresión comprende secuencias de ácidos nucleicos codificantes de la variante de zimógeno de proteína C es un vector vírico. Entre los vectores víricos que pueden utilizarse en la presente invención se incluyen de manera no limitativa, vectores adenovíricos, virus adenoasociados (VAA) de múltiples serotipos (por ejemplo VAA-1 a VAA-12 y otros) y vectores VAA híbridos, vectores lentivirus y vectores lentivirus pseudotipados [por ejemplo el virus del ébola, el virus de la estomatitis vesicular (VEV) y el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF)], los vectores virus del herpes simplex, los vectores del

virus Vaccinia, los vectores retrovíricos, los vectores lentivíricos, los vectores no víricos y otros con o sin promotores/intensificadores específicos de tejido.

En una forma de realización preferida de la presente invención, se proporcionan unos procedimientos para la administración de un vector vírico que comprende secuencias de ácidos nucleicos codificantes de un zimógeno de proteína C, o un fragmento funcional de las mismas. Los vectores VAA y los vectores lentivíricos presentan una amplia utilidad en los procedimientos de la presente invención y preferentemente no incluyen cualesquiera genes víricos asociados a patogénesis. Más preferentemente, se incluyen únicamente las partes esenciales del vector, por ejemplo los elementos ITR y LTR, respectivamente. La administración directa de vectores o la transducción *ex vivo* de las células humanas y seguida de la infusión en el cuerpo resulta en la expresión de zimógenos de proteína C, ejerciendo de esta manera un efecto terapéutico beneficioso mediante la inhibición de la metástasis tumoral. Los vectores VAA y lentivíricos recombinantes han encontrado una amplia utilidad en una diversidad de aplicaciones de terapia génica. Su utilidad para dichas aplicaciones se debe en gran medida a la elevada eficiencia de la transferencia génica *in vivo* que se consigue en una diversidad de contextos orgánicos.

Pueden utilizarse partículas de VAA o lentivíricas ventajosamente como vehículos para la administración génica eficaz. Dichos viriones presentan varias características deseables para dichas aplicaciones, entre ellas el tropismo para células que se dividen y células que no se dividen. La experiencia clínica inicial con estos vectores también demostró la falta de toxicidad sostenida y las respuestas inmunitarias eran mínimas o indetectables. Es conocido que las VAA infectan una amplia diversidad de tipos celulares *in vivo* e *in vitro* mediante endocitosis mediada por receptores o mediante transcitosis. Estos sistemas de vector han sido sometidos a ensayo en seres humanos con diana en el epitelio retiniano, hígado, músculo esquelético, vías respiratorias, cerebro, articulaciones y células madre hematopoyéticas. Es probable que los vectores no víricos basados en ADN plasmídico o minicírculos también resulten ser vectores de transferencia génica adecuados para genes codificantes de zimógeno de proteína C.

Resulta deseable introducir un vector que pueda proporcionar, por ejemplo, múltiples copias de un gen deseado y, por lo tanto, unas mayores cantidades del producto de dicho gen. Los vectores VAA y lentivíricos mejorados y los métodos para producirlos se han descrito en detalle en varias referencias, patentes y solicitudes de patente, incluyendo: Wright J.F. (Hum. Gene Ther. 20:698-706, 2009), que es la tecnología utilizada para la producción de vector de grado clínico en las instalaciones de los presentes inventores, en el Children's Hospital of Philadelphia (CHOP). El vector lentivírico puede producirse en el CHOP y los demás vectores se encuentran disponibles en el laboratorio central de producción de vectores lentivíricos, NHLBI Gene Therapy Resource Program (GTRP) - Lentivirus Vector Production Core Laboratory. Para algunas aplicaciones, un constructo de expresión puede comprender además elementos reguladores que sirven para controlar la expresión en un tipo celular o tisular particular. Dichos elementos reguladores son conocidos por el experto en la materia y se exponen en profundidad en Sambrook et al. (1989) y en Ausubel et al. (1992). La incorporación de elementos reguladores específicos de tejido en los constructos de expresión de la presente invención proporciona un tropismo tisular por lo menos parcial para la expresión de los zimógenos de proteína C o fragmentos funcionales de los mismos. Por ejemplo, pueden utilizarse secuencias de ácidos nucleicos codificantes de zimógeno de proteína C bajo el control de un promotor específico de tejido o de tipo celular para la expresión en células pulmonares o AATh-ApoE y otros para la expresión específica de hígado. Notablemente, la expresión específica de hígado debería resultar adecuada para el tratamiento de una diversidad de cánceres de diferentes tipos celulares. Los promotores específicos hematopoyéticos en vectores lentivíricos también pueden utilizarse ventajosamente en los procedimientos de la presente invención.

Procedimientos ejemplificativos para producir vectores VAA

Se ha producido VAA para la expresión génica recombinante en la línea celular renal embrionaria humana 293 y recientemente ha sido revisada exhaustivamente por el director del Clinical Vector Core del CHOP, el Dr. J.F. Wright (Hum. Gene Ther. 20:698-706, 2009). Brevemente, los vectores VAA se construyen a partir del VAA de tipo salvaje, un virus de ADN de cadena sencilla que es no patógeno. El virus parental es no patógeno, los vectores presentan una amplia gama de hospedadores y pueden infectar células tanto que se dividen como que no se dividen. El vector se construye a partir del virus eliminando los genes *rep* y *cap* y sustituyéndolos por el transgén de interés bajo el control de un promotor específico de tejido o de célula. Para la preparación de VAA recombinante, el límite superior de tamaño de la secuencia que puede insertarse entre las dos ITR es de ~5,0 kb. Los plásmidos que expresan FIX en la presente revisión bajo el control del promotor/intensificador apropiado y un segundo plásmido que proporciona las funciones de adenovirus ayudante conjuntamente con un tercer plásmido que contiene los genes *rep* y *cap* de VAA-2 se utilizaron para producir vectores VAA-2, mientras que se utilizó un plásmido que contenía los genes *cap* de VAA-1, VAA-6 o VAA-8 y el gen *rep* de VAA-2 y las ITR para producir los vectores de serotipo alternativo respectivos (Gao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11854-11859, 2002; Xiao et al., J. Virol. 73:3994-4003, 1999; Arruda et al., Blood 103:85-92, 2004). En la presente invención, la región codificante para el zimógeno de proteína C o variantes funcionales del mismo se utilizarían en lugar de los ácidos nucleicos codificantes de FIX. Los vectores VAA se purificaron mediante centrifugación repetida en gradiente de densidad de CsCl y se determinó el valor de los vectores purificados mediante hibridación de transferencia por puntos cuantitativa. Los vectores utilizados para los experimentos en perros y ratones presentados en la presente memoria fueron preparados por el Vector Core del The Children's Hospital of Philadelphia.

A partir de lo expuesto anteriormente, puede apreciarse que los polipéptidos zimógenos de proteína C y los vectores de ácidos nucleicos que expresan polipéptido zimógeno de proteína C pueden utilizarse en el tratamiento y la prevención del cáncer.

5 C. Composiciones farmacéuticas

Los vectores de expresión de la presente invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas que pueden administrarse a un sujeto, permitiendo la producción de una proteína biológicamente activa (por ejemplo un polipéptido zimógeno de proteína C o fragmento funcional o derivado del mismo) o mediante inducción de la expresión continua del transgén de zimógeno de proteína C *in vivo* mediante terapias génicas o celulares o mediante modificación *ex vivo* de las células del paciente o del donante. En una forma de realización particular de la presente invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden suficiente material genético para permitir a un receptor producir una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido zimógeno de proteína C pueden inhibir la progresión tumoral metastásica en el sujeto. Alternativamente, tal como se ha expuesto anteriormente, una cantidad eficaz del polipéptido zimógeno de proteína C variante puede infundirse directamente en un paciente que lo necesita. Las composiciones pueden administrarse solas o en combinación con por lo menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, que puede administrarse en cualquier portador farmacéutico biocompatible estéril, incluyendo, aunque de manera no limitativa, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua. Las composiciones pueden administrarse en el paciente solas o en combinación con otros agentes (por ejemplo cofactores) que influyen sobre la progresión del cáncer.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hanks, solución de Ringer o solución salina tamponada fisiológicamente. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Además, pueden prepararse suspensiones de los compuestos activos en forma de suspensiones para inyección aceitosas adecuadas. Entre los solventes o vehículos lipófilos adecuados se incluyen aceites grasos, tales como el aceite de sésamo o ésteres de ácido graso sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que incrementen la solubilidad de los compuestos, permitiendo la preparación de soluciones altamente concentradas.

La composición farmacéutica pueden proporcionarse en forma de una sal y puede formarse con muchos ácidos, incluyendo, aunque de manera no limitativa, los ácidos clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en solventes acuosos u otros solventes protónicos que las formas de base libre correspondientes. En otros casos, la preparación preferida puede ser unos polvos liofilizados que pueden contener cualquier o la totalidad de los siguientes: histidina 1-50 mM, sacarosa al 0,1%-2% y manitol al 2%-7%, en un intervalo de pH de entre 4,5 y 5,5, que se combina con tampón antes de la utilización.

Tras la preparación de las composiciones farmacéuticas, pueden introducirse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento. Para la administración de vectores codificantes o polipéptidos de zimógeno de proteína C, dicho etiquetado incluiría la cantidad, la frecuencia y el método de administración.

D. Administración

Los polipéptidos zimógeno de proteína C variantes, solos o en combinación con otros agentes, pueden infundirse directamente en un paciente en un portador biológico apropiado tal como se ha mencionado anteriormente en la presente memoria. Los vectores de expresión de la presente invención que comprenden secuencias de ácidos nucleicos codificantes de zimógeno de proteína C, o fragmentos funcionales de los mismos, pueden administrarse en un paciente mediante una diversidad de medios (ver a continuación) para conseguir y mantener un nivel profiláctica y/o terapéuticamente eficaz del polipéptido zimógeno de proteína C. El experto en la materia podrá determinar fácilmente protocolos específicos para utilizar los vectores de expresión codificantes de zimógeno de proteína C de la presente invención para el tratamiento terapéutico de un paciente particular. Los protocolos para la generación de vectores adenovíricos y la administración en pacientes han sido descritos en las patentes US nº 5.998.205, nº 6.228.646, nº 6.093.699, nº 6.100.242 y la solicitud de patente internacional nº WO 94/17810 y nº WO 94/23744, que se incorporan a la presente memoria como referencia en su totalidad.

Los vectores adenovíricos codificantes de zimógeno de proteína C de la presente invención pueden administrarse en el paciente mediante cualquier medio conocido. La administración directa de las composiciones farmacéuticas *in vivo* pueden llevarse a cabo generalmente mediante inyección utilizando una jeringa convencional, aunque se encuentran comprendidos otros métodos de administración, tales como la administración incrementada mediante convección (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.720.720). A este respecto, las composiciones pueden administrarse por vía subcutánea, epidérmica, intradérmica, intratecal, intraorbital, intramucosal, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, oral, intrahepática o intramuscular. Entre otros modos de administración se incluyen la administración oral y pulmonar, los supositorios y las aplicaciones transdérmicas. Un clínico especializado en el tratamiento de pacientes con cáncer puede determinar la vía óptima para la administración de los vectores adenovíricos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos de zimógeno de proteína C basándose en varios criterios, entre ellos,

aunque de manera no limitativa: el estado del paciente y el estadio del tumor.

La presente invención comprende además unos vectores VAA que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido zimógeno de proteína C.

Se proporcionan además unos vectores lentivirus o lentivirus pseudotipados que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido zimógeno de proteína C.

También se encuentran comprendidos unos plásmidos desnudos o vectores de expresión que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido zimógeno de proteína C.

Se proporcionan los métodos y materiales siguientes para facilitar la puesta en práctica del ejemplo I.

Células y cultivo celular

Se obtuvieron células de melanoma B16F10 murinas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco: mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F-12, Invitrogen, Carlsbad, USA) complementado con suero de feto bovino al 10% (HyClone, Logan), solución de antibiótico antimicótico al 1% (Invitrogen, Carlsbad, USA) y L-glutamina a 37°C. Se prepararon suspensiones de células individuales a partir de monocapas tratadas con EDTA 2 mM que se lavaron y se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes del recuento y la inoculación. Las células se lavaron sobre hielo hasta la inyección.

Animales

Se mantuvieron unos ratones C57Bl/6 de tipo salvaje de diez semanas de edad (Charles River, Wilmington, USA) y ratones deficientes PAR-1 (proporcionados por Patricia Andrade-Gordon, Johnson & Johnson, Langhorne, USA) en las instalaciones de cuidado animal del Children's Hospital of Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos de América, siguiendo directrices institucionales. Todos los ratones eran macho, sólo los ratones deficientes PAR-1 eran hembra. Los procedimientos en los animales se llevaron a cabo cumpliendo los Institutional Standards for Humane Care and Use of Laboratory Animals. El Institutional Animal Care and Use Committee autorizó todos los experimentos.

Producción y administración de vectores víricos adenoasociados (VAA)

La preparación de vector se llevó a cabo mediante transfección transitoria libre de virus ayudante de células HEK-293 mediante un sistema de triple transfección; el plásmido de expresión de proteína C era un constructo de ~4,5 pb que contenía un promotor específico de hígado compuesto del promotor α 1-antitripsina humana (AATh), el intensificador ApoE y la región de control hepático, acoplado con el ADNc de la proteína C murina después de una secuencia de intrón de gen B-globina sintético. Se purificó un segundo plásmido que proporcionaba las funciones de adenovirus ayudante y un tercer plásmido que contenía los vectores VAA VAA-2 *rep* y VAA-8 *cap* mediante hibridación cuantitativa de transferencia de puntos. La purificación se realizó mediante centrifugación en gradiente de densidad. En los ratones se inyectaron, antes de la inyección de células de cáncer en la vena de la cola, vectores VAA8 a dosis comprendidas entre 1×10^{12} y 1×10^{13} genomas de vector/kg. Los ratones hembra se indujeron con 2×10^{13} , ya que respondían menos a la inyección de vector. En los ratones se inyectó solución salina (sorbitol al 5%) o formas murinas de PC(A) tales como: zimógeno PC (AATh-PC), PCA (mediante la inserción de una doble secuencia RKR para un enzima intracelular de corte proteasa, PACE/furina, AATh-PCA) o mutante PCA-5A (RR229/230AA y KKK191-193AAA) con actividad anticoagulante mínimamente retenida y propiedades citoprotectoras normales (AATh-mPCA-5A). Se introdujeron estas mutaciones con el kit de mutagénesis dirigida a sitio QuickChange™ (Stratagene, La Jolla, CA) utilizando cebadores oligonucleótidos mutantes constituidos de 10 a 16 nucleótidos correspondientes en cada lado del codón mutante. Todos los fragmentos de ADNc que contenían mutaciones se secuenciaron antes de la construcción del vector.

Muestreo de sangre, ELISA de PCA murina y ensayo de actividad de proteína C

Se determinaron los niveles de actividad de PCA plasmática o PC mediante recolección de sangre a través de sangrado de la cola o punción de la vena cava (en el momento del sacrificio) en citrato 1:10 o citrato complementado con benzamidina 10 nM. Se determinaron los niveles de PCA murina utilizado anticuerpos proporcionados por el Dr. C.T. Esmon (Howard Hughes Medical Institute, Oklahoma). Brevemente, las placas se recubrieron durante la noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal AMGDPK 1587 a una concentración de 5 μ g/ml en tampón de recubrimiento (Tris 0,02 M, NaCl 0,1 M, pH 7,5). Posteriormente, las placas se bloquearon con tampón de bloqueo (Tris 0,02 M, NaCl 0,1 M, albúmina de suero bovino al 1%, pH 7,5). Se cargaron muestras de plasma murino y diluciones estándares de PCA murino (0,3 a 150 ng/ml) en la placa y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador basculante de 300 rpm durante 2 h. Las placas se lavaron con tampón de lavado (Tris 0,02 M, NaCl 0,1 M, Tween al 0,05%, pH 7,5). Se añadió espectrozima PCa (American Diagnostica, Stamford, USA) (1 mM) diluido en tampón de recubrimiento y se incubó a 37°C durante 24 h. Se midió la absorbancia a 405 nm y se obtuvieron los niveles de

PCA a partir de la curva estándar. Se midió la actividad de proteína C utilizando el ensayo de PC Actichrome (American Diagnostica, Stamford, USA). Brevemente, se incubaron 50 µl de plasma murino o diluciones estándares de PC murina en la placa de microensayo a 37°C durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 75 µl de activador (PROTAC™) (o solución salina como control negativo) y las muestras se incubaron a 37°C durante 20 minutos. Se añadió espectrozima aPC (75 µl) y la placa se incubó a 37°C durante 15 minutos. Tras la adición posterior de 50 µl de ácido acético glacial, se midió la absorbancia a 405 nm y se obtuvieron los niveles de PC a partir de la curva estándar.

Modelo experimental de metástasis pulmonar

Se inyectaron células de cáncer ($2,5 \times 10^5$) suspendidas en 200 µl de PBS en la vena lateral de la cola. Veintiún días después de la inyección de células de cáncer, los ratones se anestesiaron con isoflurano y se sacrificaron mediante punción de la vena cava. Los pulmones se fijaron directamente con paraformaldehído al 4% administrados a través de la tráquea y se extirparon después. Los pulmones se mantuvieron en solución de formaldehído hasta la sustitución del mismo tras 24 h por alcohol al 70%. Los focos tumorales sobre la superficie de los pulmones se contaron macroscópicamente de manera ciega con respecto a la intervención. Los experimentos se llevaron a cabo con 8 a 10 ratones en cada grupo.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo el análisis estadístico en GraphPad Prism versión 4.03. Los datos se expresan como medias +/- SEM. Se evaluaron las diferencias entre grupos utilizando la prueba de Mann-Whitney y la de Spearman para las correlaciones. Se consideró que la diferencia era estadísticamente significativa cuando el valor de p era <0,05.

Se proporciona el ejemplo siguiente con el fin de ilustrar determinadas formas de realización de la invención. No se pretende que sea limitativo de la invención en modo alguno.

Ejemplo 1

La administración de zimógeno de proteína C inhibe la progresión metastásica del cáncer de pulmón

La sobreexpresión de la PCA no limita la metástasis experimental, mientras que la sobreexpresión de zimógeno PC resulta altamente eficiente en la reducción de los focos tumorales pulmonares a dosis de vector VAA iguales. Con el fin de determinar el efecto de la sobreexpresión continua de PC(A) sobre la extravasación de las células de cáncer en un modelo murino de metástasis experimental, en ratones CS7Bl/6 se inyectó solución salina o vectores VAA para el zimógeno PC o PCA a una dosis de vector igual de 1×10^{13} vg/kg. La fig. 1 muestra un diagrama esquemático de los constructos utilizados para expresar proteína C activada y zimógeno PC. La figura 2 muestra los niveles de PCA y los niveles de actividad de PC en ratones sobreexpresantes de PCA y de PC, antes de la inoculación de células de cáncer. La inyección de VAA-PC indujo niveles de actividad de PC en un factor de aproximadamente 3-4 en comparación con los ratones que recibieron inyecciones de solución salina, mientras que VAA-PCA indujo niveles de PCA aproximadamente 10 veces mayores, conduciendo a un nivel plasmático medio de aproximadamente 40 ng/ml. En los ratones tratados con VAA-PCA, la actividad de PC también se incrementó moderada, aunque no significativamente, en comparación con los animales que recibieron inyecciones de solución salina.

La PCA presenta actividades anticoagulante y antiinflamatoria. Actualmente la PCA recombinante es el foco de amplios estudios para el tratamiento de la sepsis y determinados trastornos inflamatorios. Actualmente el fármaco sólo ha sido autorizado por la FDA para el tratamiento de la sepsis severa. Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, el riesgo de sangrado se incrementa significativamente con dosis crecientes de PCA, por lo que la seguridad de este enfoque resulta cuestionable. Debido a que el efecto protector de la PCA en la sepsis es independiente de la coagulación, se han creado mutantes que muestran una actividad anticoagulante reducida pero conservan propiedades antiinflamatorias.

Aunque los resultados de los presentes inventores demuestran que los ratones que expresan PCA administrada mediante un vector VAA mostraron reducciones de los sucesos de cáncer pulmonar metastásico, los datos presentados en la figura 3 muestran que la PC resultó significativamente más eficaz para este fin. Una serie de retos hemostáticos demuestran que el riesgo de hemorragia con la PCA se incrementa de manera dependiente de la dosis. Ver las figuras 4 y 5. Además, el control de la metástasis tumoral con la PCA sólo se consiguió utilizando niveles de dosis elevados. Los presentes inventores también observaron que la utilización de VAA-PCA-5A no mostró ningún efecto beneficioso y probablemente es peor que el grupo coinyección de solución salina. Estos datos sugieren que la PCA requiere propiedades tanto de anticoagulante como de citoprotección para inhibir la metástasis tumoral. En experimentos adicionales los inventores demuestran que PCA-L38D, que no puede ser activada, también es protectora. Ver las figuras 6 y 7. Este mutante ha sido descrito en Harmon S. et al. (Journal Biological Chemistry 283:30531-30539, 2008). También es significativa la observación de que el riesgo de hemorragia en ratones que expresan PC no difería respecto a la de ratones con inyección de solución salina. Ver la figura 5. De esta manera, la PC muestra una eficacia y perfil de seguridad superiores.

- Muchos cánceres (por ejemplo el melanoma, de mama, de pulmón y pancreático) muestran una morbilidad y mortalidad incrementadas debido a las elevadas tasas de metástasis. Los presentes inventores compararon los efectos del zimógeno PC sobre la metástasis experimental con el fin de discriminar entre los efectos anticoagulante y de señalización celular de la PC(A). Con este fin, los ratones que sobreexpresaban proteína C (activada) o mutantes de señalización de PCA se sometieron a un modelo de metástasis experimental establecido de inoculación intravenosa de células de cáncer de melanoma. Los presentes inventores optaron por la sobreexpresión continua de PC(A) por vectores víricos adenoasociados (VAA) ya que este enfoque evita los problemas de las proteínas recombinantes en estudios a largo plazo, es decir, semivida corta, múltiples inyecciones, niveles plasmáticos fluctuantes y costes elevados.
- 5
- 10
- 15
- 20
- Resulta interesante que el presente estudio demuestra que la sobreexpresión de zimógeno PC limita la extravasación de las células de cáncer eficientemente con independencia del nivel plasmático actual de PC. En contraste, la sobreexpresión de la PCA limita la extravasación de células de cáncer de una manera dependiente de la dosis y resulta eficaz sólo a niveles moderadamente elevados, de aproximadamente 25 ng/ml. Además, el mutante de señalización de PCA (PCASA, que no presenta actividad anticoagulante sino propiedades citoprotectoras normales) no limitó la metástasis experimental a niveles plasmáticos moderados (15 ng/ml) o elevados (30 ng/ml). Concordando con estos últimos resultados, el efecto protector del zimógeno PC aparentemente es independiente de la señalización mediada por PAR-1.
- Claramente la administración de zimógeno de proteína C proporciona una herramienta eficaz, utilizada sola o en combinación con otros agentes quimioterápicos, para el tratamiento y la inhibición de la progresión de las neoplasias malignas metastásicas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Zimógeno de proteína C en un portador biológicamente aceptable para la utilización en el tratamiento o la inhibición de la metástasis en un paciente de cáncer que lo/la necesita.
2. Zimógeno de proteína C para la utilización según la reivindicación 1, en el que dicho zimógeno de proteína C es infundido en un paciente.
- 10 3. Zimógeno de proteína C para la utilización según la reivindicación 1, en el que dicho zimógeno de proteína C se administra a dicho paciente en un vector VAA que comprende un ácido nucleico que codifica zimógeno de proteína C.
- 15 4. Zimógeno de proteína C para la utilización según la reivindicación 1, en el que dicho zimógeno de proteína C es una variante que no está activada *in vivo* y dicho cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer esofágico.
- 20 5. Zimógeno de proteína C para la utilización según la reivindicación 1, que comprende además administrar por lo menos un agente quimioterápico.
6. Zimógeno de proteína C para la utilización según la reivindicación 4, en el que dicha variante es PCA-L38D.
7. Zimógeno de proteína C para la utilización según la reivindicación 6, en el que dicha variante se administra por vía intravenosa por lo menos una vez al día a una dosis entre aproximadamente 10 y 500 µg/kg.
- 25 8. Zimógeno de proteína C para la utilización según la reivindicación 7, en el que dicha variante se administra por vía intravenosa por lo menos una vez al día a una dosis entre aproximadamente 10 y 250 µg/kg.
9. Zimógeno de proteína C para la utilización según la reivindicación 6, en el que dicha variante se encuentra encapsulada en un liposoma o mezclada con fosfolípidos o micelas.
- 30 10. Zimógeno de proteína C para la utilización según la reivindicación 2, en el que dicha proteína C zimógena es parte de una proteína de fusión.
- 35 11. Zimógeno de proteína C para la utilización según la reivindicación 10, en el que dicha proteína C zimógena se fusiona con un elemento seleccionado de entre el grupo que consiste en albúmina, un fragmento Fc y un fragmento de IgG.
- 40 12. Zimógeno de proteína C para la utilización según la reivindicación 1, en el que dicha proteína C zimógena se encuentra pegilada.
13. Zimógeno de proteína C para la utilización según la reivindicación 1, en el que dicha proteína C zimógena se encuentra sialilada.
- 45 14. Vector VAA que comprende un ácido nucleico que codifica un zimógeno de proteína C para la utilización en el tratamiento o la inhibición de la metástasis en un paciente de cáncer que lo/la necesita.
15. Vector VAA recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica PCA-L38D.
- 50 16. Célula que comprende el vector VAA según la reivindicación 15.

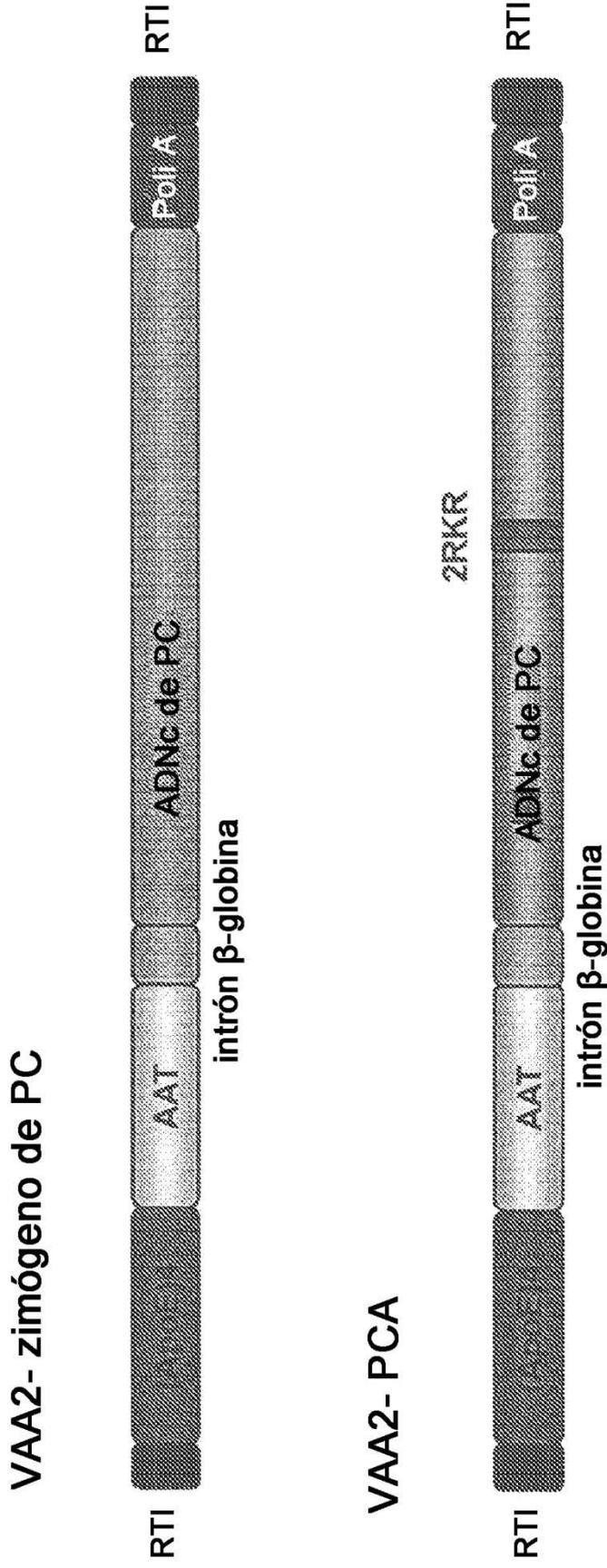


Fig. 1. Representación esquemática de los vectores víricos adenoasociados (VAA) codificantes de formas murinas de proteína C (PC) o PC activada

Fig. 2. Curso temporal de expresión de formas de PC en ratones en los que se han inyectado vectores VAA de PC o PCA. Se muestran las dosis de vector y el número (n) de ratones/grupos.

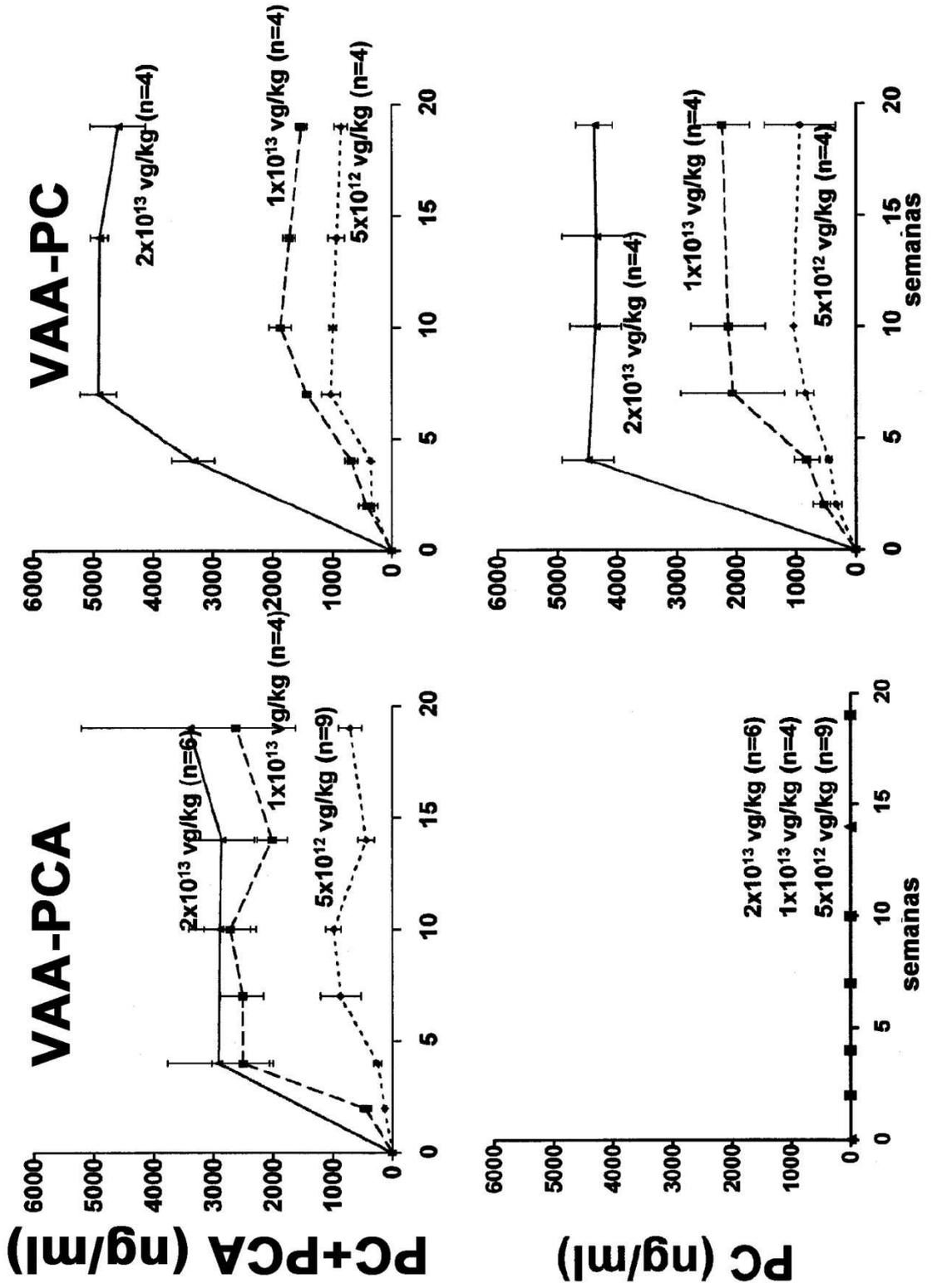


Fig. 3. Número de metástasis pulmonares de células de melanoma B16F10 en ratones que expresan formas murinas de PC o PCA y solución salina.

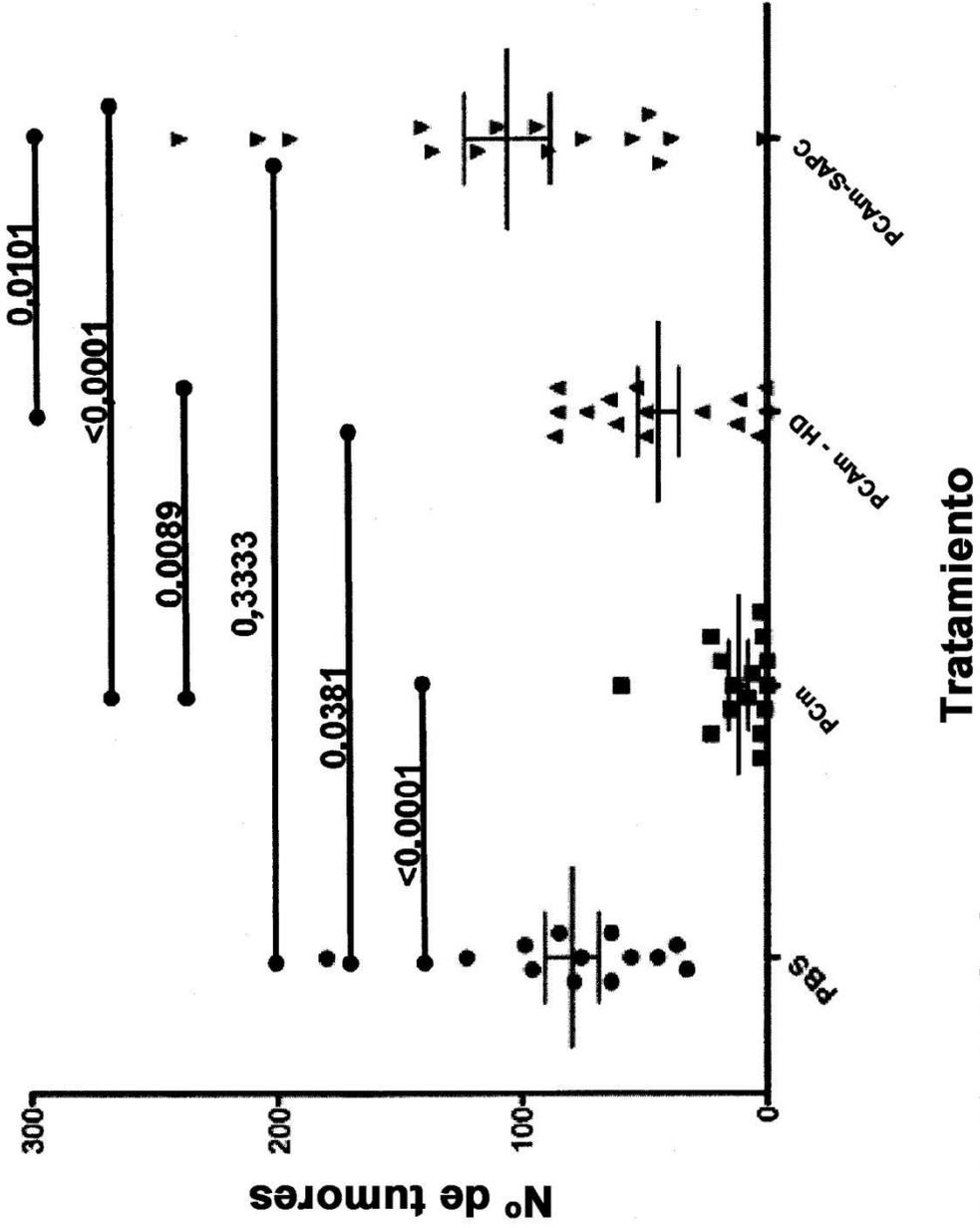
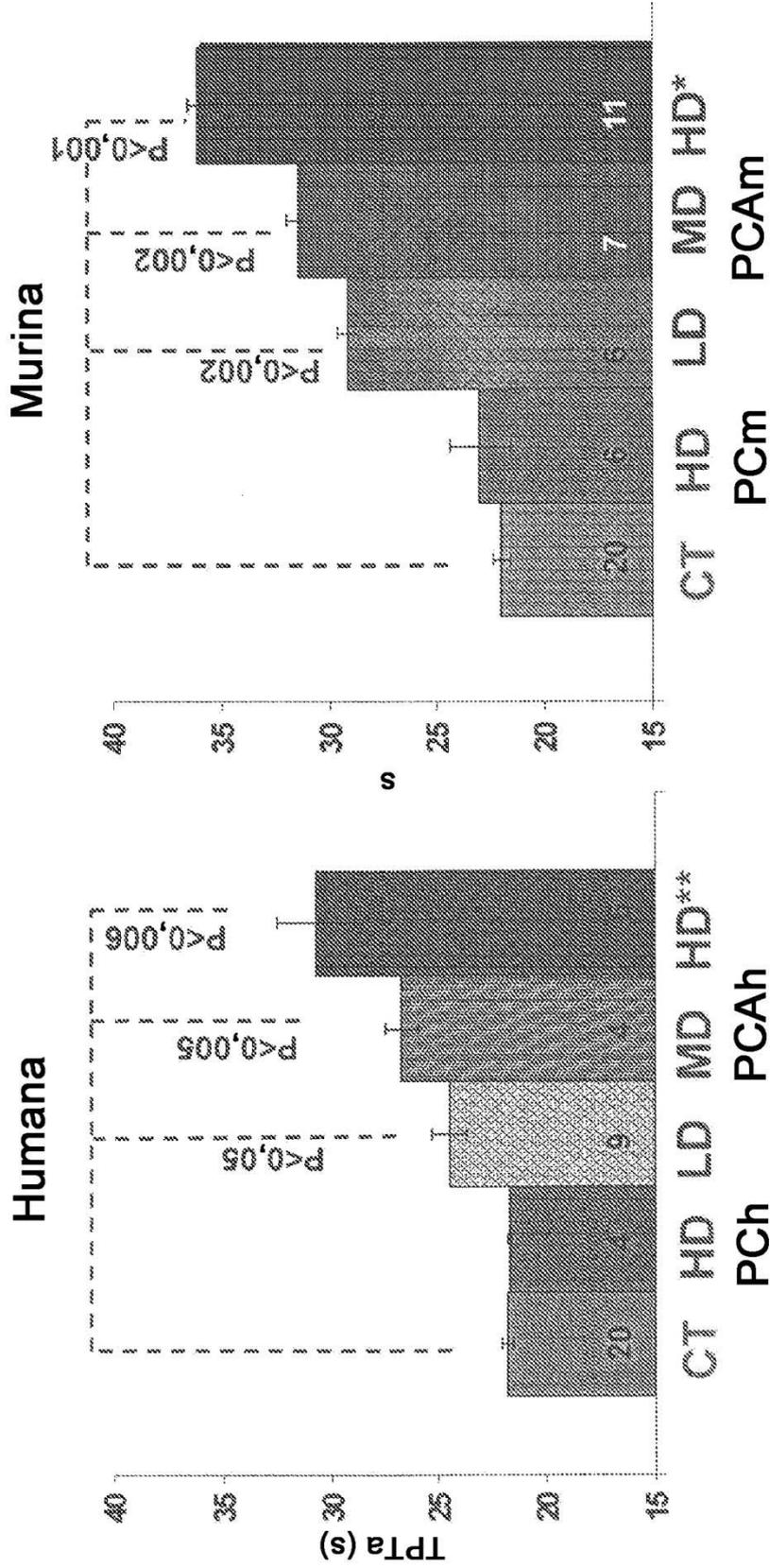


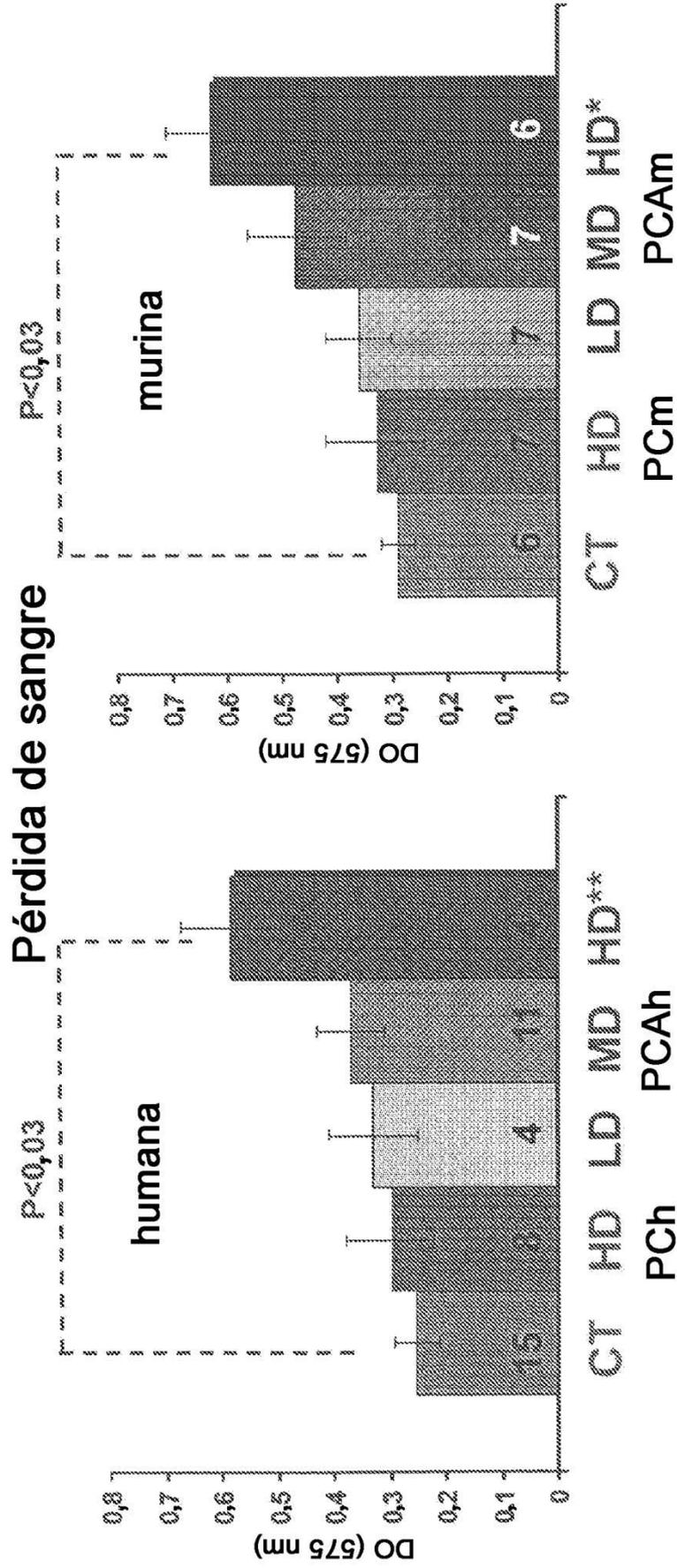
Fig. 4. Se muestra la actividad anticoagulante de PC y PCA para la proteína tanto humana como murina mediante la medición del tiempo de tromboplastina activada (TPTa). Este efecto se restringe únicamente a PCA de una manera dependiente de la dosis para ambas especies.



2x10¹³ vg/kg (HD)
 1x10¹³ vg/kg (MD)
 5x10¹² vg/kg (LD)

Se muestra en cada columna el número de ratones/grupo

Fig. 5. Pérdida de sangre (concentración de hemoglobina a DO 575 nm) tras el corte de la cola. El riesgo incrementado de hemorragia se limita a los niveles funcionales más elevados de PCA.



2x10¹³ vg/kg (HD)
 1x10¹³ vg/kg (MD)
 5x10¹² vg/kg (LD)

En cada columna se muestra el número de ratones/grupo

Recuento de tumores pulmonares B16F10

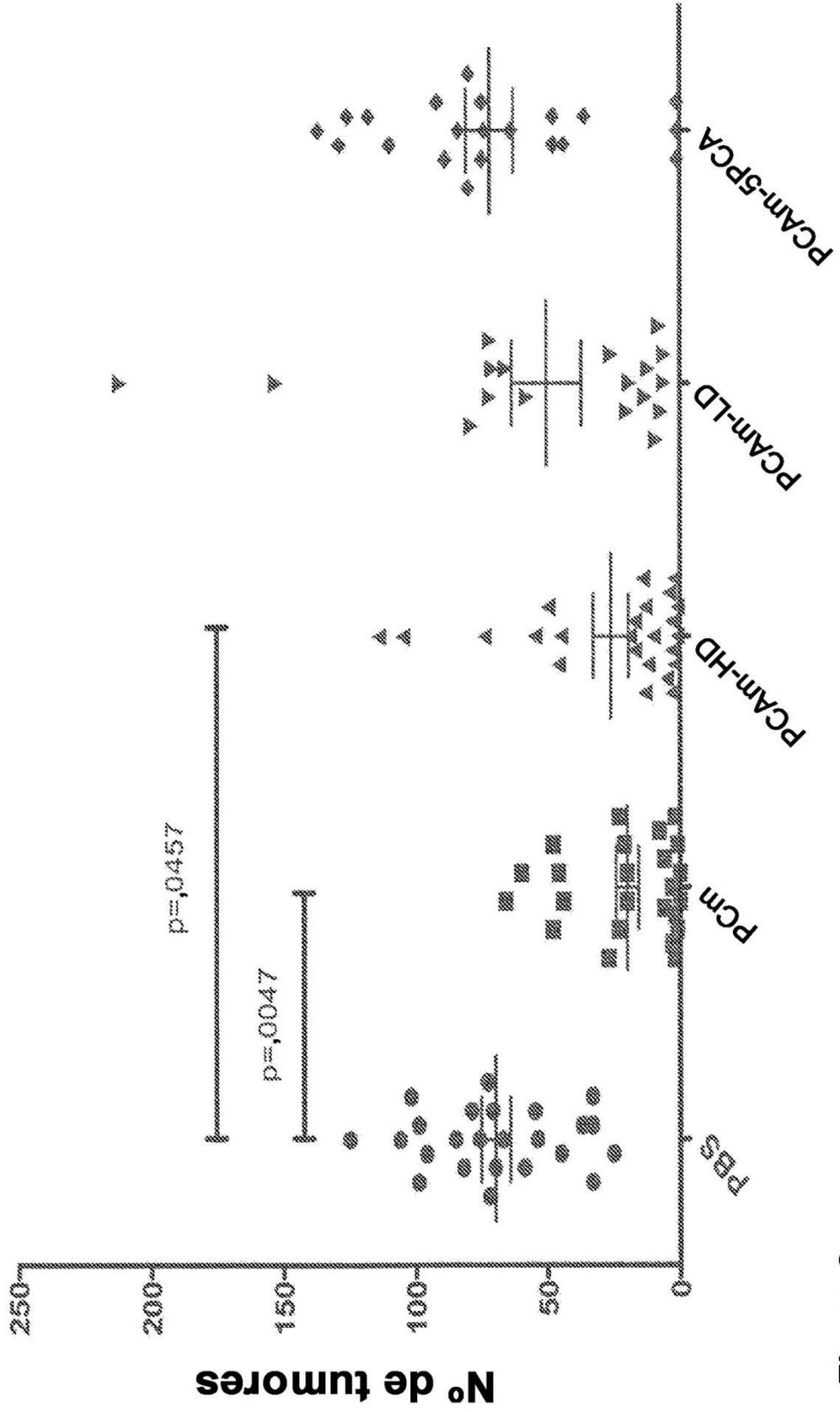
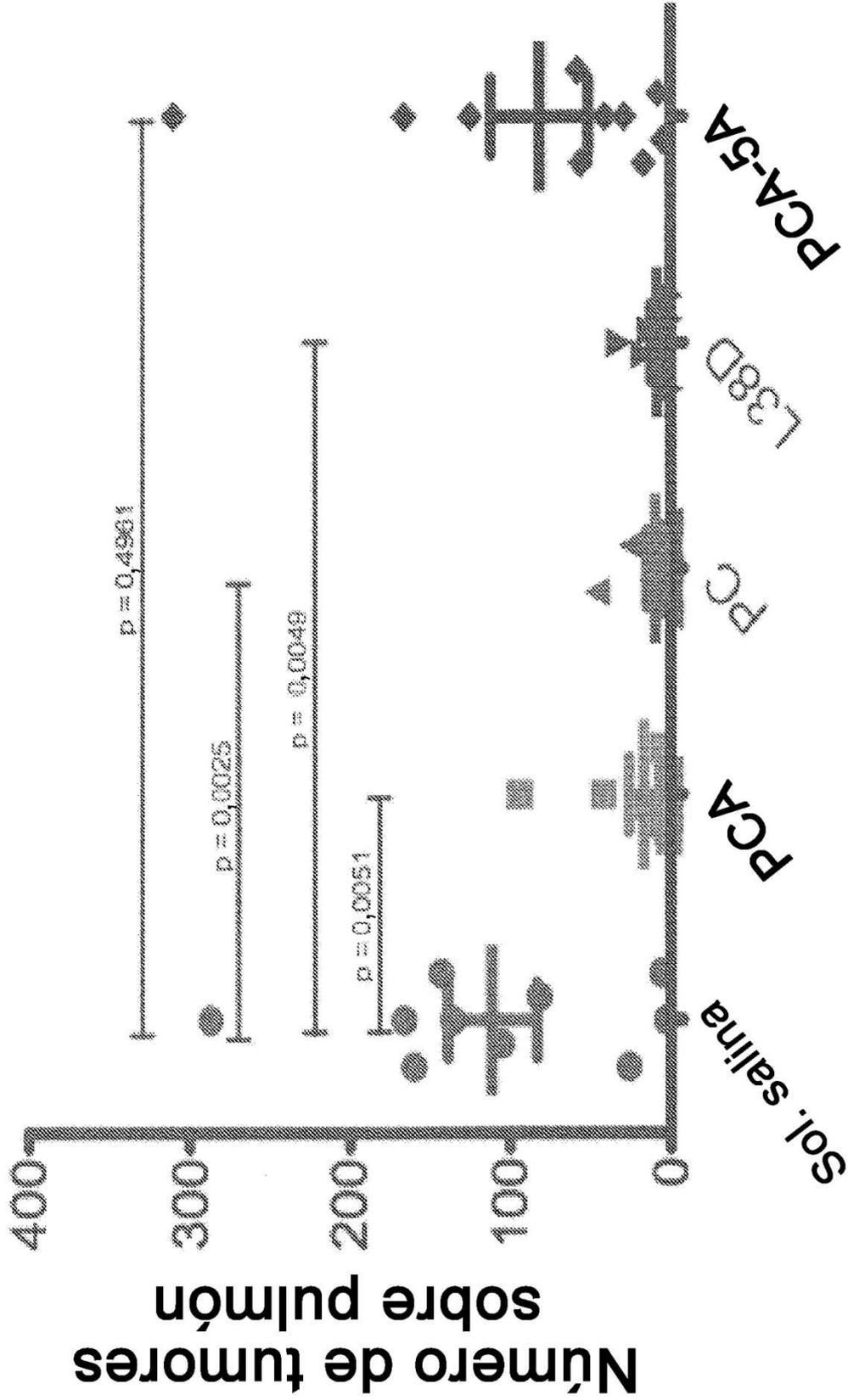


Figura 6 Tratamiento

Figura 6

Recuento de tumores B16F10 vs. Tratamiento 50 C57BL/6



Tratamiento de VAA

Figura 7