

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 652**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2007 PCT/EP2007/059948**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2008 WO08034866**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2007 E 07820390 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2064327**

54 Título: **DBAIT y usos de las mismas**

30 Prioridad:

21.09.2006 US 524528

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.09.2017

73 Titular/es:

**INSTITUT CURIE (25.0%)
26, RUE D'ULM
75248 PARIS CEDEX 05, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%);
MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
(25.0%) y
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)**

72 Inventor/es:

**DUTREIX, MARIE y
SUN, JIAN-SHENG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 633 652 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

DBAIT y usos de las mismas

5 La presente invención se refiere a composiciones y a métodos para interferir con rutas de reparación del ADN en células de mamífero. En particular, la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que interfieren con rutas de detección, señalización y/o reparación de lesiones en el ADN, en particular con la ruta de unión de extremos no homólogos (NHEJ) de reparación de roturas de doble cadena (DSB), así como a los usos de las mismas, particularmente para provocar letalidad en células de tumores sometidos a terapias anticancerosas. La invención se refiere a una nueva clase de moléculas de ácido nucleico, denominadas "DSB bait" o "Dbait", que pueden usarse en una diversidad de afecciones terapéuticas en sujetos mamíferos, para interferir con las rutas de reparación de DSB del ADN.

Antecedentes

15 La radioterapia y la quimioterapia, individualmente o combinadas con cirugía, son arsenales terapéuticos esenciales contra los cánceres humanos.

20 Las radiaciones ionizantes producen roturas de doble cadena (DSB) directa o indirectamente y provocan la muerte de células/tejidos (necrosis o apoptosis). El efecto citotóxico de la radiación ionizante constituye la base de la radioterapia, que se usa ampliamente en el tratamiento de cánceres humanos. La eficacia de la radioterapia actualmente está limitada por la radiorresistencia de ciertos tumores (por ejemplo, glioblastoma, carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello) y por los efectos secundarios producidos por la irradiación de tejidos normales próximos (por ejemplo, en el tratamiento del cáncer de mama y del cuello uterino).

25 Durante los últimos años, muchos estudios se han centrado en mecanismos biológicos relacionados con la respuesta a la radiación ionizante, para comprender mejor la complejidad de los fenómenos subyacentes a la radiosensibilidad o radiorresistencia de las células tumorales. La comprensión de las diferentes rutas que regulan con precisión la respuesta a la radiación ionizante es una etapa importante en la identificación de dianas moleculares para nuevos fármacos y terapias que, en asociación con la radioterapia, puedan mejorar la probabilidad de recuperación de tumores altamente resistentes a la radiación, tales como tumores cerebrales o de cabeza y cuello.

35 El uso de agentes quimioterapéuticos puede producir lesiones en el ADN, incluyendo DSB directas o indirectas. Son ejemplos de las familias de agentes quimioterapéuticos más utilizadas (citotóxicos químicos): inhibidores de la topoisomerasa I o II (camptotecina/topotecán, epirubicina/etopósido), agentes de reticulación del ADN (cisplatino/carboplatino/oxaliplatino), agentes alquilantes del ADN (carmustina/dacarbazina) o agentes antimetabólicos (5-fluorouracilo/gemcitabina/capecitabina), así como inhibidores de los usos mitóticos (paclitaxel/docetaxel/vinorelbina).

40 Los progresos recientes en el desarrollo de fármacos biológicos (anticuerpos monoclonales, citocinas/inhibidores de quinasa, inmunoterapias/vacunas) han demostrado su eficacia y especificidad hacia una subserie de tumores. Sin embargo, con frecuencia se usan en combinación con citotóxicos químicos. A pesar de los muchos progresos en el desarrollo de nuevos fármacos citotóxicos, la farmacorresistencia a la quimioterapia sigue siendo una preocupación clínica importante en el tratamiento del cáncer. La comprensión del mecanismo de farmacorresistencia relacionada con la captación/salida del fármaco, degradación metabólica, mutagénesis de la diana, mayor reparación y señalización de la muerte celular (apoptosis y necrosis) es esencial para asegurar la eficacia de la quimioterapia y mejorar el índice terapéutico, especialmente en algunos tumores resistentes al tratamiento.

50 En el tratamiento del cáncer se ha usado ampliamente la asociación entre quimioterapia y radioterapia. Aunque aún no se ha esclarecido completamente, la base biológica de la acción de los agentes citotóxicos se basa en mecanismos celulares tales como el ciclo celular o lesiones del ADN, lo cual también es importante en el caso de la muerte celular radioinducida, que llevan a los efectos beneficiosos aditivos o, mejor aún, sinérgicos mediante la combinación de diferentes tratamientos en terapias para el cáncer.

55 En la última década se han realizado muchas investigaciones en este campo y ha empezado a delinearse la complejidad de la transducción de señales en respuesta a la radiación. A este respecto, los genes de interés particular para establecerse como dianas con radiaciones ionizantes son los implicados en la regulación de mecanismos de letalidad inducidos por radiación, tales como apoptosis o reparación del ADN. Como las DSB son las lesiones del ADN más letales, la eficacia de la radiación ionizante se reduce según aumenta la de la reparación de las DSB.

60 En la reparación de las DSB están implicados dos mecanismos: unión de extremos no homólogos (NHEJ, ruta independiente de la secuencia) y recombinación homóloga (HR, ruta dependiente de la secuencia) (revisión por Jackson, 2002). El establecimiento como dianas de genes implicados en estas dos rutas de reparación de DSB principales, hasta ahora, ha tenido como resultado una radiosensibilidad baja o moderada, dependiendo de los

enfoques y las líneas de células cancerosas utilizadas (Belenkov *et al.*, 2002; Marangoni *et al.* 2000; Ohnishi *et al.*, 1998).

Las proteínas Ku (por ejemplo, Ku70 y Ku80) y DNA-PKcs son importantes en la reparación de las DSB de ADN inducidas por radiación o quimioterapia. Si la lesión no puede repararse a tiempo, las células mueren. Por lo tanto, representan dianas moleculares potencialmente interesantes para sensibilizar a las células y tejidos diana a la radioterapia y quimioterapia. De esta manera, se han concebido y realizado muchos enfoques para tratar de inhibir estas proteínas clave (Ku70/Ku80, DNA-PKcs, etc.) implicadas en la ruta NHEJ, que es predominante en células de mamífero:

- 1) Inhibidores de PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa) (es decir, DNA-PKcs, ATM, ATR) (Boulton *et al.*, 2000; Durant & Karran, 2003; Willmore *et al.*, 2004; Vauger *et al.*, 2004);
- 2) Dominantes negativos y péptidos (extremo C-terminal de KU80) (Marangoni *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002);
- 3) Fragmento variable de anticuerpo monocatenario (scFv) (DNA-PKcs) (Li *et al.* 2003);
- 4) Aptámero de ARN (SELEX: Ku de unión a ARN) (Yoo & Dynan, 1998);
- 5) Antisentido (Ku70, Ku80, DNA-PKcs) (Li *et al.*, 2003b; Marangoni *et al.*, 2000; Sak *et al.*, 2002);
- 6) siRNA (ARN de interferencia pequeño) (DNA-PKcs) (Peng *et al.* 2000).

A pesar de estos tremendos esfuerzos, la combinación del establecimiento como diana de genes implicados en las rutas de reparación del ADN y las terapias para el cáncer aún está en las primeras fases experimentales y ningún estudio clínico ha mostrado ningún efecto beneficioso demostrado hasta ahora. Debe tenerse en cuenta que los enfoques descritos anteriormente comparten una característica común: se dirigen a un solo efector (proteína) implicada en una ruta compleja en cascada (tal como NHEJ) con posible desviación o compensación.

Sumario de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no se incluya en las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos.

La presente divulgación se refiere a nuevas composiciones y métodos de interferencia con rutas de reparación del ADN en células de mamífero. En particular, la divulgación se refiere a moléculas de ácido nucleico que interfieren, de una manera no específica de gen, con rutas de detección, señalización y/o reparación de lesiones en el ADN, así como a los usos de las mismas, particularmente para provocar letalidad en células de tumores sometidos a terapias anticancerosas.

Los inventores han descubierto que la sensibilidad de las células a las terapias que producen lesiones en el ADN de forma directa o indirecta pueden mejorarse usando moléculas de ADNbc cortas (modificadas químicamente o no) que actúan como miméticos de fragmentos de ADN rotos y se reconocen como sitios de DSB inducidos por los tratamientos que producen lesiones en el ADN (es decir, el sustrato imita a las DSB).

Como se muestra en los ejemplos, las moléculas de esta divulgación son eficaces tanto *in vitro* como *in vivo* y pueden usarse para conferir o aumentar la sensibilidad de cualquier célula tumoral a una terapia anticancerosa que produce lesiones en el ADN.

Por lo tanto, un objeto de la invención se refiere a dichas moléculas de ADNbc, también denominadas con el nombre de moléculas "DSB bait" (abreviado Dbait), que son capaces de aumentar la respuesta de tumores resistentes al tratamiento a la radioterapia y la quimioterapia. Como se desvelará adicionalmente más adelante, las moléculas Dbait actúan atrapando y secuestrando el holocomplejo de enzimas de reparación del ADN e interfiriendo de esta manera con los procesos de detección, señalización y/o reparación de lesiones del ADN. Este nuevo enfoque se denomina "DNA bait" (cebo de ADN).

En un aspecto preferido, la divulgación se refiere a una molécula Dbait que es una molécula de ácido nucleico, en donde dicha molécula comprende una parte bicatenaria de al menos 24 pb, tiene al menos un extremo libre, carece de CpG, tiene menos de un 70 % de identidad de secuencia con cualquier gen del genoma humano, comprende uno o varios fosforotioatos o nucleótidos con esqueleto de metilfosfonato en el extremo de cada cadena o al menos en la cadena del extremo 3', y en donde dicha molécula es un sustrato de unión para al menos una proteína Ku implicada en la ruta NHEJ de reparación de roturas de doble cadena (DSB). Preferentemente, la molécula Dbait se selecciona del grupo que consiste en Dbait32Ha, Dbait32Hb, Dbait32Hc, Dbait32Hd, Dbait32Hc-3'mp, Dbait32Hc-5'3'mp, Dbait32Hc-Cy3, Dbait32Hc-Cy5 y Dbait32Hd-FITC. Aún más preferentemente, la molécula Dbait es Dbait32Hc.

Otro aspecto de la presente divulgación reside en una composición que comprende una molécula Dbait y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En un aspecto particular, la composición es adecuada para vía oral o para inyección intravenosa, intratumoral o subcutánea, o para inyección o infusión intracraneal o intraarterial, o para administración tópica.

Otro aspecto de la presente divulgación reside en una molécula Dbait en combinación con (a) uno o más agentes físicos y/o químicos que pueden producir directa o indirectamente DSB del ADN. En particular, la divulgación se refiere a un producto farmacéutico que comprende una molécula Dbait de la divulgación y un agente químico que puede producir directa o indirectamente roturas de doble cadena de ADN, como una preparación combinada para uso para el tratamiento de cánceres. Preferentemente, la molécula Dbait se va a administrar antes de o junto con el agente químico.

Otro aspecto de la presente divulgación es un método para tratar un trastorno proliferativo (por ejemplo, un cáncer) usando una combinación de una molécula Dbait y una terapia que produce directa o indirectamente una o más lesiones en el ADN. Por consiguiente, la presente divulgación se refiere al uso de una molécula Dbait de la divulgación para la fabricación de un medicamento para tratar cáncer a usar en combinación con una terapia anticancerosa que produce lesiones en el ADN. En particular, la terapia anticancerosa que produce lesiones en el ADN se selecciona entre radioterapia y quimioterapia. Preferentemente, la molécula Dbait se va a administrar antes de la radioterapia. Como alternativa, la molécula Dbait se administra antes o junto con quimioterapia. En un aspecto particular, la molécula se va a administrar por vía oral o por inyección intravenosa, intratumoral o subcutánea, o por inyección o infusión intracraneal o intraarterial o por administración tópica. Preferentemente, el cáncer se selecciona entre cáncer del SNC, de cabeza y cuello, colorrectal, hepático, del tracto gastrointestinal, del tracto genitourinario, de pulmón, de piel, de mama y del cuello uterino.

Otro aspecto de la divulgación se refiere al uso de moléculas Dbait para fabricar un adyuvante terapéutico anticanceroso para mejorar la eficacia del tratamiento del cáncer, particularmente para tumores que responden mal a la radio- y/o quimioterapia.

Un aspecto adicional de la presente divulgación es un método para mejorar la sensibilidad del tumor a la terapia anticancerosa que provoca lesiones en el ADN, comprendiendo el método administrar a un sujeto una molécula Dbait como se ha definido anteriormente.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere al uso de una molécula Dbait de la divulgación para la fabricación de un medicamento para aumentar la sensibilidad del tumor a una terapia anticancerosa que produce lesiones en el ADN. En particular, la terapia anticancerosa que produce lesiones en el ADN se selecciona entre radioterapia y quimioterapia. Preferentemente, la molécula Dbait se va a administrar antes de la radioterapia. Como alternativa, la molécula Dbait se administra antes o junto con quimioterapia. En una realización particular, la molécula se va a administrar por vía oral o por inyección intravenosa, intratumoral o subcutánea, o por inyección o infusión intracraneal o intraarterial, o es para administración tópica. Preferentemente, el cáncer se selecciona entre cáncer de SNC, de cabeza y cuello, colorrectal, hepático, del tracto gastrointestinal, del tracto genitourinario, de pulmón, de piel, de mama y del cuello uterino.

Otro aspecto de la presente divulgación es un método para tratar cáncer, comprendiendo el método administrar a un sujeto una molécula Dbait en combinación con una terapia anticancerosa que provoca lesiones en el ADN.

Otro aspecto de la presente divulgación es una composición para uso en asociación con un tratamiento de rotura de ADN, particularmente radioterapia o quimioterapia, comprendiendo dicha composición al menos una molécula Dbait en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en una cantidad eficaz a introducir en el núcleo de las células tumorales.

La invención puede usarse para conferir sensibilidad a la terapia cancerosa en diversos tipos de cánceres en sujetos mamíferos, particularmente en sujetos humanos, tales como cánceres sólidos y leucemia, particularmente cánceres radio- o quimiorresistentes.

50 Leyendas de las figuras

Figura 1.1: Ensayos de desplazamiento de banda realizados sobre diferentes moléculas Dbait radiomarcadas con ^{32}P en presencia de diversas cantidades de extracto nuclear (0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 ng/ μl) procedente de células Hep2. Las bandas desplazadas se numeraron como 1 y 2. La banda 3 es un pocillo de carga.

Figura 1.2: Identificación de la presencia de proteínas Ku en las bandas retardadas de diferentes moléculas Dbait radiomarcadas con ^{32}P que implican proteínas en extracto nuclear de células Hep2 (0, 20, 80, 320 ng/ μl). En la línea α -Ku, se indica si se añadieron anticuerpos anti-Ku (+) o no (-) a la reacción de unión antes de cargar la muestra en el gel. Las bandas desplazadas se numeraron como 1, 2 y 3 y se añadió un asterisco al número cuando las bandas mostraban una migración desplazada después de la unión de anti-Ku.

Figura 1.3: Ensayo de unión de extremos de ADN con 20 μg de extracto de proteína nuclear de Hep2. Panel superior: el ligamiento de fragmentos de ADN marcados con ^{32}P 0,2 μM en ausencia y en presencia de Dbait 20 μM en 20 μl de tampón de ensayo a lo largo de diversos tiempos. Las bandas 1-4 indican los fragmentos de ADN de 605 pb iniciales (monómeros [1]), los productos de ligamiento que migran como dímeros [2], trímeros [3] o tetrámeros [4]. Panel inferior: se cuantificó el porcentaje de productos de ligamiento y se mostró en función del

tiempo (rombos, sin Dbait; círculos, con Dbait32H 200 nM) y en función de la estructura química de moléculas Dbait (después de 2 horas de incubación con diversas Dbait 200 nM).

Figura 1.4: Ensayo de actividad proteínica quinasa dependiente de ADN (DNA-PK) en 1,5 µg de extracto de proteína nuclear de Hep2 de varias moléculas Dbait 2 µg con diversas longitudes, secuencias y estructuras químicas incluyendo esqueletos modificados: Dbait32ss y Dbait32css son dos ADN monocatenarios de 32 nt; Dbait32C es un ADN bicatenario 32 pb de tipo "dumbbell" (sin extremo romo libre); Dbait8H, Dbait16H, Dbait24H y Dbait32H son ADN bicatenarios de horquilla con un tallo de 8, 16, 24 y 32 pb, respectivamente, Dbait32H, Dbait32Hb, Dbait32Hc y Dbait32Hd son ADN de horquilla de 32 pb con diferentes secuencias pero la misma composición de bases; Dbait32d-F y DbaitHc-cy3 son Dbait32Hd y Dbait32Hc marcados con fluoresceína y cianina 3, respectivamente; Dbait32H-po es una Dbait32H fosfodiéster de longitud completa, en comparación con otras moléculas Dbait que tienen fosforotioato de 3 pb en el extremo romo libre, excepto DbaitHc-3'mp y Dbait32Hc-5'3'mp, que tienen metilfosfonato de 3 nt en el extremo 3' o tanto en el extremo 5' como en el extremo 3', respectivamente. Dbait32Hc5'5' tiene un enlace 3'-3', presentando de esta manera un extremo romo 5'/5'; véanse en la tabla 1.1 y en la tabla 1.2 los detalles de estas moléculas Dbait. Los datos representan el valor medio y la desviación típica de al menos 3 experimentos independientes.

Figura 2.1: Ensayo de supervivencia clonogénico de células Hela después de 4 irradiaciones de 0,5 Gy (a intervalos de 2 horas) realizadas con rayos γ de una fuente de ¹³⁷Cesio en presencia de diversas moléculas Dbait. Panel A: Dependencia de la dosis del número de clones de supervivencia normalizada en presencia de Dbait32 y Dbait32H. Panel B: Número de clones de supervivencia normalizada en presencia de diferentes moléculas Dbait a 83 nM (concentración en medio de cultivo).

Figura 2.2: Ensayo de supervivencia clonogénico adicional de células Hela después de 4 irradiaciones de 0,5 Gy (a intervalos de 2 horas) realizadas con rayos γ desde una fuente de ¹³⁷Cesio en presencia de diversas moléculas Dbait. Panel superior: Dependencia de la dosis del número de clones de supervivencia normalizada en presencia de Dbait32H y Dbait8H. Panel inferior: número de clones de supervivencia normalizada en presencia de diferentes moléculas Dbait 2 µg.

Figura 2.3: Inhibición de la integración ilegítima potenciada por radiación de un fragmento de plásmido lineal (2 µg) que lleva el gen que codifica la resistencia a neomicina por moléculas Dbait32H 2 µg.

Figura 2.4: Ensayos adicionales de la inhibición de la integración ilegítima potenciada por radiación de un fragmento de plásmido lineal (2 µg) que lleva el gen que codifica la resistencia a puomicina por diversas moléculas Dbait32 (2 µg). Panel superior: dependencia de la dosis de la molécula Dbait32H en presencia de irradiación fraccionada (4 x 0,5 Gy) (círculos rellenos) o en ausencia de irradiación (triángulos rellenos); panel inferior: la eficacia de integración del plásmido en presencia de diversas moléculas Dbait 2 µg o inhibidores de DNA-PK 200 µM (wortmanina o NU7026) y con irradiación (negro) o sin ella (gris).

Figura 2.5: Inmunodetección de sitios de rotura de doble cadena (DSB) revelados por focos γ-H2AX en células Hela transfectadas por moléculas Dbait32H-FITC fluorescentes 2 horas después de la irradiación con 2 Gy. Panel izquierdo: fluorescencia de Dbait32H-FITC (puntos y manchas brillantes) y sitios de DSB detectados por inmunofluorescencia de anticuerpo de γ-H2AX en núcleos; panel derecho: la misma imagen de núcleos con sitios de DSB detectados por inmunofluorescencia de anticuerpo de γ-H2AX y contratinción DAPI. Las flechas en la esquina inferior izquierda muestran la ausencia de señal de Dbait32H-FITC y γ-H2AX en el núcleo. Las flechas en la esquina superior derecha muestran las señales de γ-H2AX y Dbait32H-FITC colocalizadas.

Figura 2.6: Panel superior: fosforilación de histona H2AX por PIKK. Se analizaron extractos celulares totales por transferencia de western con respecto al nivel de forma fosforilada de histona H2AX (γ-H2AX) en comparación con la proteína H2AX total. Se transfectaron células Hep2 durante 5 horas con diversas moléculas Dbait 32Hc, 24H, 16H y 8H durante 5 h, o se dejaron sin transfectar. Se irradiaron al final de la transfección, se incubaron durante una hora y después se analizaron. Los resultados se presentan como un histograma de relación normalizada de γ-H2AX/H2AX. Panel inferior: cinética de la persistencia de sitios de DSB revelados por focos γ-H2AX por FACS en las células irradiadas (IR): Dbait32Hc+IR (línea continua), IR solo (línea de trazos) y no tratadas (línea de puntos).

Figura 3.1: Análisis FACS de las células GMA32 no tratadas, las células transfectadas solas o transfectadas con diferentes moléculas Dbait por Lipofectamine, pero sin irradiación adicional o tratamiento con inhibidor mitótico. La fase M1 representa el porcentaje de células en estadio sub-G1 indicativo de muerte celular.

Figura 3.2: Inmunodetección de focos de reparación de ADN por marcaje con γ-H2AX (puntos o manchas brillantes en núcleos) en las células GMA32 no tratadas, las células transfectadas solas o transfectadas con diferentes moléculas Dbait por Lipofectamine. La contratinción de las membranas celulares y los núcleos se consiguió por FITC-DOC6 y DAPI.

Figura 3.3: Análisis por transferencia de western del estado de fosforilación de resto de serina 15 de p53 de las células GMA32 no tratadas, las células transfectadas solas o transfectadas con diferentes moléculas Dbait por Lipofectamine, pero sin irradiación adicional o tratamiento con inhibidor mitótico.

5 Figura 3.4: Supervivencia clonogénica de células GMA32 no tratadas y tratadas por irradiación con 4 Gy o por diferentes inhibidores mitóticos (nocodazol 200 nM, navelbina 100 nM (vinorelbina) o taxol 200 nM (paclitaxel)) en presencia de diferentes moléculas Dbait.

10 Figura 4.1: Crecimiento del tumor de laringe humano xenoinjertado en ratones supervisado como la relación del volumen tumoral a tiempo t con respecto al volumen inicial (V_t/V_i) con o sin tratamientos. Panel A: conjunto sin tratar (n = 38); Panel B: conjunto de control con 20 μ l de medio de cultivo (MEM) + irradiación 3 x 2 Gy/semana (n = 30); Panel C: el conjunto con 1 nmol (20 μ g) de Dbait32H + irradiación 3 x 2 Gy/semana (n = 35). Se suministró MEM o Dbait32H por inyección intratumoral 5 horas antes de la irradiación. La dosis de irradiación dividida (2 Gy) se administró uno de cada dos días, tres veces por semana. El tratamiento duró 5 semanas con una irradiación total de 30 Gy. Los puntos representan el transcurso de tiempo del volumen tumoral de cada ratón. Las líneas continuas son el mejor ajuste polinomial. El panel D muestra un gráfico de Kaplan-Meier de todos los ratones de los que el aumento en el volumen tumoral (V_t/V_i) < 5.

20 Figura 4.2: Distribución de Dbait32H marcado con cianina C3 en tumor de xenoinjerto Hep2 en ratones desnudos. Se inyectaron 20 μ g de Dbait32H-Cy3 formulado con Superfect (agente de transfección) en un tumor Hep2 de 1,5 cm³. Los ratones se sacrificaron 6 horas después de la inyección. Los tumores se recogieron y se crioseccionaron para el análisis sin fijación. Se usó DAPI para la tinción de los núcleos.

25 Figura 4.3: Radiosensibilización de tumores xenoinjertados Hep2 en ratones desnudos. Se supervisó el crecimiento tumoral durante el tratamiento (15 sesiones en 35 días; fondo gris) y después del tratamiento (fondo blanco) en cuatro grupos de 10 animales con diferentes tratamientos. Se indica el crecimiento del tumor individual para cada animal. El protocolo de tratamiento se indicó en la parte superior. Para cada sesión de tratamiento, se inyectó Dbait32H 2 μ g formulado con agente de transfección (PEI) en el tumor 5 horas antes de la irradiación de 2 Gy. También se indican los tiempos medios para el aumento de 5 veces del volumen tumoral en cada grupo. El valor de p se calculó para el grupo que recibió el tratamiento combinado en comparación con el grupo que recibió la irradiación sola.

35 Figura 4.4: Panel superior: representación de Kaplan-Meier de supervivencia de ratones desnudos con xenoinjertos subcutáneos de tumor Hep2. El protocolo de tratamiento se describió en la Figura 4.3. Se incluyeron los cinco grupos: no tratado, transfectado de forma simulada e irradiado, tratado por irradiación combinada y aumento de cantidad de Dbait32H (20, 60 y 120 μ g/sesión). En la tabla 3.2 se indica el número de animales para cada grupo. El fondo gris indica el periodo de tratamiento. Panel inferior: imágenes de tumores representativos de los tres grupos (no tratado, tratado con 20 y 60 μ g de Dbait32H/sesión asociado con irradiación de 2 Gy) que se tomaron 15 días después de empezar el tratamiento, al final del tratamiento (35 días) y 13 días después de finalizar el tratamiento (35+13 días).

40 Figura 4.5: Análisis histológico de tumores Hep2 xenoinjertados a mitad del tratamiento (7 sesiones). Los tumores se cogieron 20 días después de empezar los diversos protocolos de tratamiento según se indica. Se fijaron en formalina y se tiñeron secciones de tejido con hematoxilina, eosina y azafrán. Se analizaron dos tumores para cada protocolo de tratamiento por microscopía. Panel a: imágenes de campos representativos de cada protocolo. Las barras de escala indican 400 μ m (paneles 1-4) y 100 μ m (paneles 5-8). Las imágenes de color están disponibles a petición. Panel b: el grado de necrosis se expresa como la proporción de área de superficie de la sección de tejido analizado que era necrótica. El número de células mitóticas y células apoptóticas se estimó a partir de campos no necróticos representativos de aproximadamente 1.000 células analizadas a alta potencia.

45 Figura 4.6: imágenes de RMN de tumores Hep2 xenoinjertados a mitad del tratamiento (7 sesiones). Se mostraron tres imágenes de sección transversal representativas con el tumor no tratado, el tumor tratado por irradiación (2 Gy/sesión) y por la combinación de Dbait32H (20 μ g/sesión) e irradiación (2 Gy/sesión). Los tumores están perfilados por un círculo blanco. La masa gris dentro del tumor indicaba el área necrótica.

50 Figura 4.7: Representación de Kaplan-Meier de supervivencia de ratones desnudos xenoinjertados por vía subcutánea con diversos tumores (Hep2: carcinoma de células escamosas; U87: glioblastoma; LU1205 y SK28: dos tipos de melanoma). El periodo de tratamiento se indica por el área gris.

55 Figura 5.1: Panel A: protocolo de tratamiento para tres grupos/conjuntos de los ratones transgénicos K-Ras^{V12G} x Apc^{1638N} a la edad media de 12 semanas: el grupo de control (no tratado), el grupo tratado por 5FU+CPT11, el grupo tratado por 5FU+CPT11 y Dbait32H. Se realizó mediante tres ciclos de tratamiento. Cada ciclo consiste en la inyección intraperitoneal de 0,6 mg de 5FU y 0,6 mg de CPT11, junto con 0,1 mg de Dbait32H por administración oral, tres veces por semana, seguido de una semana de reposo. El número de ratones implicados en cada grupo se indica entre paréntesis. El criterio de valoración es el tiempo de supervivencia; Panel B: gráfico

de Kaplan-Meyer de curvas de supervivencia de los tres grupos; Panel C: la mediana del tiempo de supervivencia de tres grupos como se muestra en el panel B.

5 Figura 5.2: Número medio de tumores en el tracto digestivo por animal por macroscopía o examen histológico de los grupos tratados con 5FU+CPT11 y con 5FU+CPT11 y Dbait32H. El número de animales en cada grupo se indicó entre paréntesis. Todos los ratones se sacrificaron dos semanas (semana 18) después del protocolo mostrado en el panel superior. El número medio del conjunto de control (grupo no tratado, n=101) es 30,8/animal (datos no mostrados).

10 Figura 5.3: Análisis de microscopía de fluorescencia del tejido del tracto digestivo. Panel A: esquema del protocolo (i.p.: inyección intraperitoneal; o.: administración oral). Panel B: fluorescencia de moléculas Dbait32H-FITC (izquierda) y de γ -H2AX marcada con inmunofluorescencia (derecha) en la sección de 5 μ m procedente del tejido tumoral del animal tratado de acuerdo con el protocolo proporcionado en el panel A. Las partes inferiores muestran los detalles (usando objetivos de 63 aumentos) de la zona indicada en las partes superiores (usando objetivos de 10 aumentos, recuadro blanco). La colocalización de Dbait32H-FITC fluorescente y γ -H2AX marcada aparece como puntos brillantes sobre núcleos contrateñidos con DAPI.

Descripción detallada de la invención

20 Como se ha analizado anteriormente, la invención desvela una nueva clase de moléculas terapéuticas que pueden interferir, de una manera no específica de gen, con sistemas de reparación del ADN en células de mamífero. Estas nuevas moléculas, denominadas moléculas Dbait, son sustratos de los holocomplejos de proteínas implicados en la ruta NHEJ (ruta independiente de la secuencia), particularmente proteínas Ku y/o DNA-PKcs, y pueden neutralizar la capacidad de reparación de ADN de las células, aumentando de esta manera su sensibilidad a los tratamientos que producen lesiones en el ADN.

De esta manera, la invención se refiere a dichas moléculas, a su fabricación y a su uso terapéutico, particularmente para tratar enfermedades proliferativas en combinación con un tratamiento que produce lesiones en el ADN.

30 Las moléculas Dbait de la presente divulgación pueden definirse por varias características, tales como su longitud mínima, la presencia de un extremo libre al menos y la presencia de una parte bicatenaria. Como se analizará más adelante, una característica importante de las moléculas Dbait es que su secuencia de nucleótidos precisa no impacta sustancialmente sobre su actividad. Además, las moléculas Dbait pueden contener un esqueleto modificado y/o no natural.

35 Por consiguiente, un primer aspecto de la presente divulgación reside en una molécula de ácido nucleico, en donde dicha molécula comprende una parte bicatenaria de al menos aproximadamente 16 pb, tiene al menos un extremo libre y se une al menos a un complejo Ku implicado en la ruta NHEJ.

40 La molécula preferentemente es de origen no humano (es decir, su secuencia de nucleótidos y/o conformación (por ejemplo, de horquilla) no existe como tal en una célula humana), más preferentemente de origen recombinante y/o sintético.

45 De acuerdo con el mecanismo de acción de las moléculas Dbait, la secuencia de las moléculas Dbait juega un papel pequeño o nulo. Por consiguiente, a diferencia de las moléculas usadas en la técnica anterior para la dirección específica de gen/proteína (por ejemplo, antisentido, antígeno, siRNA, aptámero, ribozima, etc.), las moléculas Dbait pueden no tener un grado significativo de homología o identidad de secuencia con genes conocidos, promotores, potenciadores, secuencias cadena arriba 5' o 3', exones, intrones, etc. En otras palabras, la acción de las moléculas Dbait para interferir con la ruta NHEJ es independiente de la secuencia, y las moléculas Dbait pueden tener menos de un 70 %, incluso menos de un 50 % de identidad de secuencia con cualquier gen de un genoma humano.

50 Este mecanismo de acción independiente de la secuencia es un rasgo característico de las moléculas Dbait, que las distingue claramente de otros agentes terapéuticos específicos de gen o específicos de proteína (dependientes de la secuencia) tales como oligonucleótidos antisentido, ARN de interferencia pequeño (siRNA, shRNA y miRNA) y oligonucleótidos CpG inmunoestimuladores, así como aptámeros diseñados para atrapar una proteína específica.

55 En un aspecto preferido, la secuencia de las moléculas Dbait tiene un grado de identidad global con secuencias de ácido nucleico humanas que es menor de aproximadamente un 70 %, 60 %, 55 % o 50 %. Los métodos para determinar la identidad de secuencia son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, Blast.

60 En un aspecto particular, la molécula Dbait no hibrida, en condiciones rigurosas, con ADN genómico humano. Las condiciones rigurosas típicas son tales que permiten distinguir ácidos nucleicos completamente complementarios de ácidos nucleicos parcialmente complementarios (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*).

En un aspecto preferido, la secuencia de las moléculas Dbait carece de CpG para evitar las reacciones inmunológicas mediadas por receptor de tipo toll bien conocidas, si dicho efecto es indeseable. CpG se refiere a un dinucleótido que consiste en una citosina seguida por una guanina.

5 Considerando su mecanismo de acción, la longitud de las moléculas Dbait puede ser variable, siempre que sea suficiente para permitir una unión apropiada del complejo de proteína Ku. La sección experimental muestra que la longitud mínima de las moléculas Dbait es de aproximadamente 16 pb, para asegurar la unión a un complejo Ku. Preferentemente, las moléculas Dbait comprenden entre 16 y 200 pb y, más preferentemente, entre 24 y 100 pb. Los ejemplos específicos de moléculas Dbait contienen 24 pb, más preferentemente 32 pb. Como se muestra en los
10 ejemplos, dicha longitud es suficiente para permitir la unión de un complejo Ku que comprende Ku y proteínas DNA-PKc.

Las moléculas Dbait particularmente preferidas comprenden 24-100 pb y, más ventajosamente, 32-100 pb.

15 Las moléculas Dbait de acuerdo con la divulgación deben tener al menos un extremo libre, como un mimético de DSB. Dicho extremo libre puede ser un extremo romo libre o un extremo cohesivo 5'/3'. En un aspecto particular, contienen únicamente un extremo libre. En otro aspecto particular, contienen dos extremos libres.

20 Las moléculas Dbait pueden ser lineales o, preferentemente, estar constituidas por ácidos nucleicos bicatenarios en horquilla. En este caso, el bucle puede estar formado por ácidos nucleicos u otros grupos químicos conocidos por un experto en la materia, preferentemente un enlazador tal como hexaetilenglicol o tetra-desoxitimidilato (T4).

En un aspecto preferido, las moléculas Dbait son tales que:

25 1) las moléculas Dbait de doble cadena pueden captarse por células/tejidos corporales al interior del núcleo celular cuando se usan en vehículos/excipientes farmacéuticamente aceptables;
2) dicho al menos un extremo libre de las moléculas Dbait se puede reconocer por el holocomplejo de enzimas implicado en los procesos de detección, señalización y/o reparación de lesiones de DSB;
30 3) dicho al menos un extremo libre de las moléculas Dbait es susceptible, mediante dicho complejo, de incorporarse en el ADN genómico de la célula tumoral.

En un aspecto particular, las moléculas Dbait tienen una estructura no replicativa debido a su estructura y/o esqueleto.

35 A este respecto, las moléculas Dbait de acuerdo con la divulgación pueden tener exclusivamente o principalmente (por encima de un 50 %) un esqueleto fosfodiéster nativo o un esqueleto fosfodiéster modificado químicamente, u otro esqueleto con grupos químicos o mezclas de grupos químicos, siempre que el ADNbc modificado permanezca como un sustrato para el holocomplejo implicado en la ruta NHEJ, particularmente proteínas Ku y DNA-PKcs, así como la ruta de detección o señalización de lesiones de DSB. Ventajosamente, las modificaciones químicas están
40 destinadas a conferir estabilidad química a las moléculas Dbait y/o prevenir su replicación adicional (posible causa de efecto mutagénico) tras su integración genómica, si esta se produce.

45 También pueden tener miméticos de azúcar tales como 2'-O-alquilribosa, 2'-O-alquilribosa ramificada C4', ciclobutilos u otros compuestos carbocíclicos o hexitol en lugar del grupo pentofuranosilo.

La Dbait preferida comprende uno o varios grupos químicos al final de una o de cada cadena. Los grupos químicos preferidos comprenden fosforotioatos. Como alternativa, la Dbait preferida tiene nucleótidos con esqueleto de metilfosfonato.

50 Otros esqueletos modificados de la divulgación comprenden fosforamidatos, ácido morfolino nucleico, ácido nucleico bloqueado con puentes 2'-O,4'-C metileno/etileno, ácido péptido nucleico (PNA), y enlaces interazúcar alquilo de cadena corta o cicloalquilo, o enlaces intra-azúcar heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta de longitud variable, o cualquier nucleótido modificado conocido por un experto en la materia.

55 La patente de Estados Unidos n.º 5.677.437 describe enlaces oligonucleosídicos heteroaromáticos. También pueden usarse enlazadores de nitrógeno o grupos que contienen nitrógeno para preparar miméticos de oligonucleótidos (patentes de Estados Unidos n.º 5.792.844 y 5.783.682). La patente de Estados Unidos n.º 5.637.684 describe compuestos oligoméricos de fosforamidato y fosforotioamidato. También se prevén oligonucleótidos que tienen estructuras de esqueleto morfolino (patente de Estados Unidos n.º 5.034.506). En otros aspectos, tal como el
60 esqueleto de péptido-ácido nucleico (PNA), el esqueleto fosfodiéster del oligonucleótido puede reemplazarse con un esqueleto de poliamida, uniéndose las bases directas o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza del esqueleto de poliamida. Otros oligonucleótidos sintéticos pueden contener restos de azúcar sustituidos que comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, OCH₃, SCH₃, F, OCN, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)_nNH₂ o (CH₂)_nCH₃ donde n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo inferior C1 a C10, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; 0-S-; o N-alquilo; 0-, S- o N-alqueno; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO; NO; N₃.

Dicho o dichos elementos no replicables pueden incorporarse en la posición interna o en el extremo del fragmento bicatenario. Este o estos elementos pueden comprender: a) una unidad que no puede usarse como plantilla para la replicación de ADN, tal como una cadena de polietilenglicol, preferentemente una cadena de hexaetilenglicol, o cualquier cadena de hidrocarburo, finalmente interrumpida y/o sustituida por uno o más heteroátomos, por ejemplo, oxígeno, azufre, nitrógeno o grupos heteroatómicos o heterocíclicos que comprenden uno o más heteroátomos; b) una unidad que es un elemento bloqueante ya que no es susceptible a las ADN polimerasas o exonucleasas, tal como cualquier nucleótido modificado en el extremo 3', u otros conocidos por el experto en la materia; c) un oligonucleótido nativo tal como Tn, cuando se usa en el bucle de un fragmento de horquilla, tal como tetradexoxitimidilato (T4).

Dichas cadenas se obtienen por síntesis químicas, semibiosíntesis o biosíntesis, cualquier método de amplificación seguido de cualquier método de extracción y preparación y cualquier modificación química.

La bioactividad de las moléculas Dbait puede evaluarse por ensayos *in vitro* y ensayos basados en células cultivadas, como se describe, por ejemplo, en los ejemplos 2 y 3, y/o también por ensayos *in vivo*, como se describe, por ejemplo, en los ejemplos 4 y 5. El ensayo más fácil y relevante es el ensayo de la actividad proteína quinasa dependiente de ADN (véase el ejemplo 2, Figura 1.4). Este ensayo sencillo ha sido predictivo hasta ahora de la actividad *in vivo* de moléculas Dbait. Sin embargo, también son relevantes otros ensayos basados en células cultivadas, tales como el ensayo de la inhibición de la integración ilegítima potenciada por radiación (véase el ejemplo 3, Figura 2.3 y Figura 2.4).

En un aspecto particular, las moléculas Dbait de esta divulgación pueden activar la DNA-PK.

En un aspecto particular, las moléculas Dbait de esta divulgación pueden inhibir la integración de ADN ilegítima potenciada por radiación.

En otro aspecto particular, las moléculas Dbait de esta divulgación se unen a un complejo Ku *in vitro*, por ejemplo, como se determina por ensayo de desplazamiento en gel. Dicho complejo Ku puede comprender una o varias proteínas Ku únicamente, tales como Ku70 y/o Ku80, o una combinación de una o varias proteínas Ku y al menos una proteína DNA-PKc.

En otro aspecto particular, las moléculas Dbait de esta divulgación penetran en el núcleo.

Las moléculas Dbait más preferidas de esta divulgación combinan varias o todas de las características anteriores.

Los experimentos realizados en células cultivadas y en tumores xenoinjertados en ratones desnudos y ratones modificados genéticamente han demostrado que las moléculas Dbait de esta invención provocan letalidad en células/tejidos de tumores sometidos a radio- y/o quimioterapia.

Por lo tanto, la invención también se refiere a composiciones adyuvantes a usar en asociación con un tratamiento de ruptura de ADN, comprendiendo dichas composiciones una molécula Dbait tal como se ha definido anteriormente, en combinación con un vehículo/excipientes farmacéuticamente aceptable, en una cantidad eficaz a introducir en el núcleo de células tumorales.

La invención también se refiere a un método para promover la sensibilidad de tumores a terapias anticancerosas que comprende, en asociación

- introducir en la célula/tejido canceroso moléculas Dbait tales como las que se han definido anteriormente, e
- inducir en las células la ruptura de ADN por un método que produce lesiones en el ADN.

De acuerdo con un aspecto de la divulgación, en dicha etapa de introducción se usa un agente de transfección.

Basándose en el protocolo usado en los estudios *in vivo*, la divulgación proporciona una base lógica para establecer un protocolo clínico del uso de moléculas Dbait en combinación con radioterapia o quimioterapia. La base lógica subyacente a cualquier protocolo es que las moléculas Dbait deben administrarse en el núcleo de las células cuando se producen lesiones en el ADN. Por lo tanto, las moléculas Dbait preferentemente se administrarán antes de radioterapia, aunque pueden administrarse junto con uno o más agentes quimioterapéuticos dependiendo del modo de administración y la farmacocinética de cada fármaco.

Un protocolo típico comprende la administración de moléculas Dbait antes de la irradiación, por ejemplo 5 horas. El uso de una irradiación fraccionada es particularmente eficaz, por ejemplo, 15 x 2 Gy en seis semanas, o 6 x 5 Gy en dos semanas.

Ventajosamente, dicho método comprende acoplar el tratamiento con moléculas Dbait con una quimioterapia doble. Por ejemplo, 5FU y CPT 11 se inyectan conjuntamente 3 veces, 3 días consecutivos, dejando una semana completa de reposo. Como alternativa, el tratamiento con moléculas Dbait se asocia con radioterapia.

Un experto en la materia podrá adaptarlo fácilmente a seres humanos, particularmente dependiendo del peso/superficie corporal del paciente.

5 En un aspecto preferido, las moléculas Dbait son moléculas Dbait modificadas químicamente tales como se han definido anteriormente y de otras prácticas en terapia humana.

10 En otro aspecto, las moléculas Dbait no están modificadas químicamente y corresponden a fragmentos de ácido nucleico nativos, pero presentan las características de fragmentos modificados químicamente, particularmente tienen el número de pares de bases y propiedades definidas con respecto a dichas moléculas Dbait modificadas químicamente.

Más particularmente, la ruptura de la cadena de ADN se consigue por radiación ionizante (radioterapia) o reacción química (quimioterapia).

15 Dicho método es un nuevo adyuvante terapéutico junto con terapias que producen lesiones en el ADN para el tratamiento de enfermedades debidas a una proliferación celular incontrolada, en particular cáncer. En otras palabras, Dbait está destinada principalmente a usarse en terapias anticancerosas, pero también puede usarse en muchos tratamientos antiproliferativos, tal como para el tratamiento de la psoriasis.

20 Este método se puede adaptar para tratar trastornos proliferativos:

Estos pueden ser no malignos, tales como psoriasis y estenosis/reestenosis proliferativa vascular.

25 Pueden ser malignos.

El órgano o región afectada puede ser: pulmón y bronquios, cabeza y cuello, tracto gastrointestinal, cáncer colorrectal, tractor genitourinario, órganos ginecológicos, mama, sistema endocrino, piel, retina, SNC, órganos hematológicos, metástasis de sitio primario conocido o desconocido, y otros (timo, por ejemplo).

30 La naturaleza histológica puede ser epitelial, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma transicional, derivado de fibroblastos/angioblastos (sarcomas), neuronal, derivado de la glía, endocrino, carcinoide, estroma gastrointestinal, endotelial, hematopoyético y embrionario.

35 La invención también se refiere al uso de dichas moléculas Dbait no modificadas químicamente para fabricar fármacos anticancerosos para el tratamiento de tumores, particularmente tumores altamente resistentes a radio- y/o quimioterapias, usándose dichos fármacos en asociación con un tratamiento de rotura de ADN (por ejemplo, que produce lesiones), particularmente radioterapia o quimioterapia.

40 *In vivo*, las moléculas Dbait modificadas químicamente o no modificadas se administran por cualquier vía apropiada con vehiculos/excipientes aceptables apropiados, tal como administración oral, intravenosa o intratumoral, inyecciones subcutáneas, administración tópica, o por otras vías.

45 Otro aspecto de esta divulgación es una composición para uso en asociación con un tratamiento de rotura de ADN, particularmente radioterapia o quimioterapia, comprendiendo dicha composición al menos una molécula Dbait en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en una cantidad eficaz para introducirse en el núcleo de células tumorales. Por ejemplo, cuando se usa la administración intratumoral, dicha cantidad eficaz es de al menos 0,01 mg por 1 cm³ de tumor, preferentemente 0,1 mg por 1 cm³ de tumor, más preferentemente 0,5 mg por 1 cm³ de tumor. La cantidad eficaz puede administrarse en un protocolo de tratamiento diario (por ejemplo, 5 días por semana durante 3 a 6 semanas consecutivas o 3 veces por semana durante 3 a 6 semanas consecutivas). Como alternativa, puede administrarse una cantidad eficaz de al menos 0,1 mg por 1 cm³ de tumor, preferentemente 0,5 mg por 1 cm³ de tumor, más preferentemente 1 mg por 1 cm³ de tumor, en un protocolo de tratamiento semanal durante 3-6 semanas consecutivas, por ejemplo. Cuando se usan otras vías de administración, el experto en la materia puede adaptar la cantidad para obtener una cantidad eficaz de las moléculas Dbait en el tumor de al menos 0,01 mg por 1 cm³ de tumor, preferentemente 0,1 mg por 1 cm³ de tumor, más preferentemente 0,5 mg por 1 cm³ de tumor, en particular en un protocolo de tratamiento diario, o para obtener una cantidad eficaz de las moléculas Dbait en el tumor de al menos 0,1 mg por 1 cm³ de tumor, preferentemente 0,5 mg por 1 cm³ de tumor, más preferentemente 1 mg por 1 cm³ de tumor, en particular en un protocolo de tratamiento semanal. Por supuesto, la dosificación y el régimen pueden adaptarse por un experto en la materia teniendo en cuenta el régimen de quimioterapia y/o radioterapia.

60 Otro aspecto de esta divulgación reside en el uso de una molécula Dbait como se ha definido anteriormente para la fabricación de una medicina para aumentar la sensibilidad celular (por ejemplo, de un tumor) a una terapia que produce lesiones en el ADN.

Otro aspecto de esta divulgación reside en el uso de una molécula Dbait como se ha definido anteriormente para la fabricación de una medicina para tratar cáncer en combinación con una terapia anticancerosa que produce lesiones en el ADN.

- 5 Preferentemente, la terapia anticancerosa que produce lesiones en el ADN se selecciona entre radioterapia y quimioterapia. Además, preferentemente, la molécula se administra antes de la radioterapia y/o antes de y/o junto con la quimioterapia.

10 Otras características y ventajas de la divulgación se proporcionarán en los siguientes ejemplos, haciendo referencia a las figuras y tablas adjuntas.

Ejemplos

15 Se realizaron estudios moleculares y celulares, así como ensayos, en tumores humanos radiorresistentes xenoinjertados (carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello, glioblastoma, melanoma) en ratones desnudos y en un tumor inducido por doble mutación Ras^{V12G} x Apc^{1638N} en el tracto digestivo en ratones transgénicos, con el fin de:

- 20 i) evaluar las actividades biológicas de las moléculas Dbait;
 ii) validar el enfoque de "DNA bait" usando moléculas Dbait para la sensibilización frente a terapias anticancerosas;
 iii) esclarecer mecanismos moleculares y celulares subyacentes a la sensibilización mediada por Dbait observada. Los resultados de estas investigaciones se indican y resumen en los ejemplos.

25 Ejemplo 1: Diseño, síntesis y preparación de moléculas Dbait.

Se diseñaron dos tipos de moléculas Dbait: fragmentos de ADNbc lineal o de horquilla. Para las moléculas Dbait de horquilla, se usó como bucle un enlazador de hexaetilenglicol o un tetradexoxitimidilato.

30 El extremo o los extremos del tallo de ADNbc pueden protegerse frente a la degradación química por 3' exonucleasas mediante la incorporación de fosforotioatos, metilfosfonatos o enlaces nucleotídicos 3'-3'. En principio, pueden usarse otras modificaciones químicas siempre que sean compatibles con la unión de Ku70/Ku80 y la activación de DNA-PKcs (Martensson & Hammarten, 2002). Se ensayaron diferentes moléculas Dbait con diversas longitudes de tallo, 8 pb (Dbait8H), 16 pb (Dbait16H), 24 pb (Dbait24H) y 32 pb (Dbait32H como se describe en el documento WO-A-2005/040378), así como diferentes secuencias de tallo. También se diseñó, como control, un fragmento de ADNbc de tipo "dumbbell" (Dbait32C) en el que los dos extremos estaban sellados por dos bucles de hexaetileno. Algunas moléculas Dbait se marcaron a través de una etiqueta T con fluoresceína (Dbait32H-FITC), cianina 3 (Dbait32H-Cy3), cianina 5 (Dbait32Hc-Cy5) o biotina (Dbait32H-Biot). Las tablas 1.1, 1.2 y 1.3 resumieron las secuencias y estructuras químicas de las moléculas Dbait usadas en este trabajo.

40 Tabla 1.1: Secuencias y estructuras químicas de moléculas Dbait. Las letras en mayúscula son nucleótidos con esqueleto fosfodiéster. Las letras en mayúscula y en negrita son nucleótidos con esqueleto de fosforotioato. La línea continua en forma de semicírculo simboliza el enlazador de hexaetilenglicol. Dbait32-T4 contiene cuatro timinas (T₄) como enlazador en lugar de un enlazador de hexaetilenglicol. Dbait32C es una molécula de tipo dumbbell (cerrada).
 45 Dbait32Hc-5'5' tiene una secuencia revuelta (la misma composición de bases pero en orden diferente, véase Dbait32Hb en la tabla 1.1) y un enlace 3'-3'. Dbait32Ha, Dbait32Hb, Dbait32Hc y Dbait32Hd tienen la misma composición de bases pero en diferente orden en comparación con la secuencia de Dbait32H.

Moléculas Dbait Secuencia y estructuras químicas

Dbait32	5' ACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCGGATCT 3' 3' TGCGTGCCCAACAACCAGCAAACAAGCCTAGA 5'
Dbait32-T4	5' ACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCGGATCT 3' TGCGTGCCCAACAACCAGCAAACAAGCCTAGA \curvearrowright T ₄
Dbait32H-po	5' ACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCGGATCT 3' 3' TGCGTGCCCAACAACCAGCAAACAAGCCTAGA 5' \curvearrowright
Dbait32H	5' ACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCGGATCT 3' 3' TGCGTGCCCAACAACCAGCAAACAAGCCTAGA 5' \curvearrowright
Dbait24H	5' ACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGT 3' \curvearrowright 3' TGCGTGCCCAACAACCAGCAAACA 5' \curvearrowright
Dbait16H	5' ACGCACGGGTGTTGGG 3' \curvearrowright 3' TGCGTGCCCAACC 5' \curvearrowright
Dbait8H	5' ACGCACGG 3' \curvearrowright 3' TGCGTGCC 5' \curvearrowright
Dbait32Ha	5' GCTAGGCTGTTTGGTGGCTTTGCAGTGGCAC 3' \curvearrowright 3' CGATCCAGACAAACCACCGAAACGTCACCGTG 5' \curvearrowright
Dbait32Hb	5' GCTAGGCTGTTTGGTGGCTTTGCAGTGGCAC 3' \curvearrowright 3' CGATCCGAACAAACGACCCAACATCCGTGTCG 5' \curvearrowright
Dbait32Hc	5' GCTGTGCCCAACAACCAGCAAACAAGCCTAGA 3' \curvearrowright 3' CGACACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCGGATCT 5' \curvearrowright
Dbait32Hd	5' GCTAGGCTGTTTGGTGGCTTTGCAGTGGCAC 3' \curvearrowright 3' CGATCCAGACAAACCACCGAAACGTCACCGTG 5' \curvearrowright
Dbait32Hc-3'mp	5' GCTGTGCCCAACAACCAGCAAACAAGCCTAGA 3' \curvearrowright 3' cgacACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCGGATCT 5' \curvearrowright
Dbait32Hc-5'3'mp	5' gctGTGCCCAACAACCAGCAAACAAGCCTAGA 3' \curvearrowright 3' cgacACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCGGATCT 5' \curvearrowright
Dbait32Hc-5'5'	5' GCTAGGCTGTTTGGTGGCTTTGCAGTGGCAC 3' \curvearrowright 5' C3' -3' GATCCGAACAAACGACCCAACATCCGTGTCG 5' \curvearrowright
Dbait32-NH ₂	5' ACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCGGATCT 3' -NH ₂ 3' TGCGTGCCCAACAACCAGCAAACAAGCCTAGA 5' -NH ₂
Dbait32C	\curvearrowleft 5' ACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCGGATCT 3' \curvearrowright 3' TGCGTGCCCAACAACCAGCAAACAAGCCTAGA 5' \curvearrowright
Dbait32ss	5' ACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCGGATCT -3'
Dbait32Hcss-po	5' GCTGTGCCCAACAACCAGCAAACAAGCCTAGA 3'

Secuencias y estructuras químicas de moléculas Dbait

5
10
Tabla 1.2: Secuencias y estructuras químicas de diversas moléculas Dbait marcadas como se indica. Las letras en mayúscula son nucleótidos con esqueleto fosfodiéster. Las letras en mayúscula y negrita son nucleótidos con esqueleto de fosforotioato. Las letras en minúscula y negrita son nucleótidos con esqueleto de metilfosfonato. La línea sólida en forma de semicírculo simboliza un enlazador de hexaetilenglicol. Se indican diversas moléculas Dbat8Hc, Dbait32H, Dbait32Hc y Dbait32Hd marcadas (cianina 3 o 5, FITC).

Dbait32H-FITC	
Dbait32H-Cy3	5' ACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCGGATC t3' \curvearrowright
Dbait32H-Biot	3' TGCGTGCCCAACAACCAGCAAACAAGCCTAGA 5' \curvearrowright t = con etiqueta de fluoresceína (FITC), cianina 3 (Cy3) o biotina (Biot)
Dbait8Hc-Cy3	5' GCTGTGCA 3' \curvearrowright 3' CGACACG t5' \curvearrowright t = con etiqueta T de cianina 3 (Cy3)
Dbait32Hc-Cy3	5' GCTGTGCCCAACAACCAGCAAACAAGCCTAGA 3' \curvearrowright
Dbait32Hc-Cy5	3' CGACACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCGGATC t5' \curvearrowright t = con etiqueta T de cianina 3 (Cy3) o cianina 5 (Cy5)

Secuencias y estructuras químicas de moléculas Dbait

20

Tabla 1.3: Secuencias y estructuras químicas de moléculas Dbait64 y Dbait64L de 64 pb. Las letras en mayúscula son nucleótidos con esqueleto fosfodiéster. Las letras en mayúscula y negrita son nucleótidos con esqueleto de fosforitoato. La línea continua simboliza un enlazador de hexaetilenglicol.

Dbait64
 5' **ACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCGGATCTACGCACGGTCGTTTGTTCGGTGTTCGGGATCT**3'
 3' **TGCGTGCCCAACCCAGCAAAACAAGCCTAGATGCGTGCCAGCAAAACAAGCCACAACCCGCTAGA**5'

Dbait64L
 5' **ACGCACGGGTGTTGGGTCGTTTGTTCGGATCT** — **ACGCACGGTCGTTTGTTCGGTGTTCGGGATCT**3'
 3' **TGCGTGCCCAACCCAGCAAAACAAGCCTAGA** — **TGCGTGCCAGCAAAACAAGCCACAACCCGCTAGA**5'

Todas las moléculas Dbait se obtuvieron por síntesis de oligonucleótidos en fase sólida automática (Eurogentec, Bélgica). Se purificaron por HPLC de fase inversa en condiciones desnaturalizantes.

5 Para el control de calidad se usaron electroforesis capilar en gel en condiciones desnaturalizantes y MALDI-TOF/LC-MS. Más del 90 % de los oligonucleótidos tienen longitud completa. Todas las muestras se liofilizaron antes del transporte.

10 Tras la recepción, todas las muestras se disolvieron en agua destilada dos veces. Las concentraciones de moléculas Dbait se calcularon a partir de la absorbancia a 260 nm (Cantor & Warshaw, 1970) en condiciones desnaturalizantes (60 °C-90 °C dependiendo de la estabilidad térmica de las moléculas Dbait). Las concentraciones de moléculas Dbait marcadas con colorante fluorescente se calcularon a partir de la absorbancia a la longitud de onda apropiada del colorante particular (FITC: $\epsilon = 80000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 490 nm; Cy3: $\epsilon = 150000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 550 nm; Cy5: $\epsilon = 250000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 650 nm). El fragmento de ADNbc de tipo "dumbbell" (Dbait32C) se preparó hibridando y ligando mediante la ADN ligasa de T4 (BioLabs) dos semihorquillas que llevaban enlazador de hexaetilenglicol y con extremos 3' cohesivos y
15 complementarios.

Basándose en las consideraciones termodinámicas y cinéticas, se usaron los siguientes protocolos para preparar las muestras de moléculas Dbait, de acuerdo con su molecularidad:

20 - Para moléculas Dbait bimoleculares (Dbait32, Dbait32-NH2, Dbait64 y Dbait64L):

25 La mezcla de solución madre 1:1 (mayor concentración posible) de cada cadena en agua bidestilada tiene que calentarse a 90 °C durante 5 minutos para conseguir la desnaturalización completa de cada cadena. La hibridación se realizó mediante un retorno gradual a la temperatura ambiente (las muestras típicamente se dejan en un baño de agua) y las moléculas dúplex resultantes se almacenaron en alícuotas a -20 °C.

- Para moléculas Dbait monomoleculares (horquilla):

30 La solución que contiene una concentración 200 μM de moléculas Dbait en horquilla en agua bidestilada tiene que calentarse a 90 °C durante 5 minutos para conseguir la desnaturalización completa. La hibridación tiene que realizarse enfriando las muestras en agua con hielo (0 °C). El almacenamiento de las alícuotas se realizó a -20 °C.

35 Ejemplo 2: Análisis bioquímico de moléculas Dbait.

Como primera etapa para analizar el mecanismo de acción de las moléculas Dbait, se realizó una serie de ensayos de desplazamiento de banda con diferentes moléculas Dbait radiomarcadas con ^{32}P en presencia de extractos de proteína nuclear procedentes de células Hep2 de acuerdo con el protocolo convencional. Típicamente, se incubaron moléculas Dbait radiomarcadas con ^{32}P a una concentración 10 nM en presencia de diversas concentraciones de
40 proteínas nucleares (0, 10, 20, 40, 80, 160 y 320 ng/ μl) a 30 °C durante 10 minutos en tampón TBE. Después, las muestras se cargaron en un gel nativo de acrilamida al 5 %. La electroforesis se realizó a 95 V durante 2 horas a 4 °C. El gel se secó y se exploró mediante un Phosphorimager (Molecular Dynamics).

45 La Figura 1.1 muestra el patrón de bandas retardadas de la titulación de extractos de proteína nuclear de Hep2 con diversas moléculas Dbait de diferentes longitudes. Excepto la molécula Dbait de 8 pb de longitud más corta (Dbait8H), se observaron hasta 2 bandas retardadas para moléculas Dbait más largas. Se observó una banda retardada para las moléculas Dbait de 16 y 24 pb de longitud (Dbait16H y Dbait24H), mientras que se observaron dos bandas retardadas para las moléculas Dbait de 32 pb de longitud (Dbait32H, Dbait32H-po y Dbait32). Para las moléculas Dbait de 32 pb, la intensidad de la banda retardada 1 aumenta y después se reduce según aumenta la
50 concentración de proteína, mientras que la intensidad de la banda retardada 2 aumenta en función de la concentración de extractos de proteína nuclear.

La combinación de ensayos de inmuno adhesión y de desplazamiento de banda con anticuerpo monoclonal de ratón anti-Ku70 (Santa Cruz Biotechnology) reveló que las bandas retardadas 1 y 2 contienen el complejo Ku. Las bandas
55 1 y 2 se desplazaron adicionalmente hasta las bandas 1* y 2* tras la adición de anticuerpo anti-Ku70 (figura 1.2). Es probable que la banda 1 tenga un complejo Ku70/80 unido a la Dbait de 16 a 32 pb, mientras que la banda 2 tiene dos complejos Ku70/80 unidos a las moléculas Dbait de 32 pb. Los experimentos de control realizados con proteínas Ku purificadas confirmaron esta interpretación.

60 La identificación de proteínas Ku indica claramente que las moléculas Dbait interaccionan con la maquinaria de NHEJ de una manera dependiente de la longitud.

65 Se supervisó la unión de extremos de ADN incubando fragmentos de ADN lineales de 605 pb marcados con ^{32}P con extracto nuclear de Hep2 en presencia de diversas moléculas Dbait. Los productos de ligamiento migran como dímeros, trímeros o tetrámeros, a partir del monómero de 605 pb.

La Figura 1.3 muestra el efecto de diversas moléculas Dbait sobre la reacción de unión a los extremos de ADN en los extractos nucleares de células Hep2. Aproximadamente el 16 % de las moléculas de ADN dúplex lineales romas marcadas con ^{32}P se ligaron en dímeros y trímeros durante las dos primeras horas de incubación. La cantidad de productos de ligamiento de alto peso molecular aumentó hasta un 30 % del ADN aportado total después de 16 h. Cuando se añadió Dbait32H a la reacción en un exceso molar de 100 veces en comparación con el fragmento marcado con ^{32}P lineal, la reacción se inhibió fuertemente. También se observó una inhibición similar de actividad de unión de extremos con extractos preparados a partir de células HeLa (datos no mostrados). En la mayoría de los experimentos, se añadió Dbait32H simultáneamente con los fragmentos de ADN marcados al extracto nuclear. Cuando se incubó Dbait32H con el extracto durante 30 minutos antes de la adición de los fragmentos, el grado de inhibición fue similar. Por el contrario, cuando se añadió Dbait32H 30 minutos después del extracto nuclear, no hubo inhibición del ligamiento (datos no mostrados). Estos datos indican que las moléculas Dbait son competidores de la reacción de unión a los extremos de ADN, pero no desplazan el complejo unido.

Se ensayaron diversas moléculas Dbait con respecto a su efecto sobre el ensayo sin células añadiendo las moléculas al extracto nuclear e incubando durante 2 h con los fragmentos de ADN. El ligamiento no se vio afectado en gran medida por la molécula corta (Dbait8H), la molécula larga de 32 nucleótidos de una sola cadena (Dbait32ss) o la molécula de tipo "dumbbell" (Dbait32C). Dbait24H y Dbait16H, que se unen únicamente a un heterodímero Ku, inhibían el ligamiento tan eficazmente como Dbait32H. Estos datos indican que el religamiento de fragmentos de ADN se inhibe fuertemente por moléculas Dbait que pueden reclutar Ku.

Se supervisó la actividad DNA-PK se supervisó usando el kit del sistema de ensayo de proteína quinasa dependiente de ADN SignaTECT (Promega, Madison, Estados Unidos). Se ensayaron cantidades crecientes de extracto nuclear de Hep2 (limpio de ADN endógeno por filtración con DEAE-Sepharose) en presencia de Dbait 250 nM. El extracto, sustrato peptídico biotinilado y diversas cantidades de extracto nuclear se incubaron durante 5 minutos a 30 °C con (γ - ^{32}P)ATP de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El sustrato biotinilado se capturó en una membrana de estreptavidina, se lavó y se contó en un contador de centelleo. El porcentaje de fosforilación se calcula dividiendo la radiactividad unida por el recuento total de (γ - ^{32}P)ATP por muestra. Las reacciones (10 μl) se realizaron en KOAc 60 mM, 100 $\mu\text{g/ml}$ de BSA, $\text{Mg}(\text{Cl})_2$ 0,5 mM, 1 μl de ADN ligasa de T4 y tampón 10X (Promega, Madison, Estados Unidos). El extracto nuclear y Dbait se incubaron 2 minutos antes de la adición de ADN marcado con ^{32}P (10 ng). Las muestras se incubaron varias veces a 37 °C antes de detener el ligamiento por EDTA 20 mM y la adición de 1 mg/ml de proteinasa K. Los productos de ligamiento se analizaron por electroforesis a través de geles de agarosa al 0,7 % seguido de autorradiografía y cuantificación utilizando un Phosphorimager.

La Figura 1.4 muestra la actividad de la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PK) de varias moléculas Dbait 2 μg con diversas longitudes, secuencias y estructuras químicas incluyendo esqueletos modificados, en 1,5 μg de extracto de proteína nuclear de Hep2. La actividad quinasa dependía directamente de la longitud y estructura del "tallo" bicatenario de la molécula Dbait. Se observó una alta activación de DNA-PK con las moléculas Dbait de 32 pb de longitud que se unieron por dos complejos diméricos Ku. Las moléculas Dbait que se unieron solo a un dímero de Ku (Dbait16H y Dbait24H) fueron tan ineficaces como la Dbait8H corta que no se unía a Ku. De forma similar, el complejo Dbait32ss/Dbait32css monocatenario y Dbait32C de tipo "dumbbell", que no tienen extremos bicatenarios libres, no activaban la DNA-PK. Además, diversas modificaciones del esqueleto (fosforotioato, metilfosfonato, enlace 3'-3') en el extremo romo libre (hasta 3 pb), así como los ligandos marcados internamente (por ejemplo, colorantes fluorescentes), son capaces de activar la actividad DNA-PK. Debe tenerse en cuenta que la actividad DNA-PK no depende significativamente, si lo hace en alguna medida, de la secuencia de las moléculas Dbait, como se muestra por Dbait32H, Dbait32Hb, Dbait32Hc y Dbait32Hd.

Este ensayo sencillo de la actividad DNA-PK sin células indica que solo se necesitan la longitud (al menos aproximadamente 32 pb) y el ADN bicatenario con un extremo libre de las moléculas Dbait para la activación de la quinasa, independientemente de su secuencia y de las modificaciones químicas hasta cierto punto. Esto es coherente con la implicación de DNA-PK en la ruta NHEJ, un mecanismo de unión a extremos del ADN independiente de la secuencia.

Ejemplo 3: actividad *in vitro* de moléculas Dbait

La actividad de las moléculas Dbait en células cultivadas se estudió por ensayos de supervivencia clonogénicos en dos líneas celulares de cáncer humanas radorresistentes derivadas de un carcinoma de cuello de útero de una mujer (HeLa) y de HNSCC (Hep2) en asociación con radiación ionizante, mediante la inhibición de la integración ilegítima de un fragmento de ADN exógeno y mediante la detección de los focos de DSB persistentes después de la irradiación en las células transfectadas por moléculas Dbait.

Para los estudios en animales, se usaron líneas celulares humanas establecidas Hep2 (carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello, HNSCC), LU1205 y SK28 (melanomas). Los estudios de las células en cultivo se realizaron usando Hep2, HeLa S3 (carcinoma del cuello uterino epitelial), MO59K y MO59J (glioblastoma). Las células se cultivaron a 37 °C en cultivos de monocapa en DMEM completo que contenía suero bovino fetal inactivado térmicamente al 10 % (FBS; Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia) y antibióticos (100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomomicina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina) en condiciones de 100 % de humedad, 95 % de aire y 5 % de CO_2 . LU1205

se cultivó en MCDB que contenía FBS inactivado térmicamente al 4 %, glutamina al 1 % y antibióticos (100 µg/ml de estreptomomicina y 100 µg/ml de penicilina).

Se recogieron células en crecimiento exponencial en placas de seis pocillos y se incubaron con 700 ml de DMEM completo que contenía una mezcla de moléculas Dbait y reactivo Superfect (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) en una relación de 10 µl de Superfect por µg de ADN. Después de 5 h a 37 °C en condiciones convencionales, las células se lavaron con PBS y se añadió DMEM completo. Cuando se indica, las células se expusieron a irradiación en una sesión (10 Gy) 5 h después de empezar la transfección o en cuatro sesiones de 0,5 Gy administradas con una unidad de ¹³⁷Cs (1 Gy/min) 3, 4, 5 y 6 h después del inicio de la transfección y se dejaron crecer durante dos semanas. Cuando se midió la integración del plásmido, se añadieron 2 µg de plásmido a la transfección de Dbait y se añadió puromicina (1,7 µg/ml) al medio de crecimiento 48 h después de la transfección. La eficacia de transfección del plásmido se estimó analizando en 10.000 células la expresión de GFP en un citómetro de flujo FACScan (FACSalibur, Beckton-Dickinson, Estados Unidos).

3.1) Letalidad celular inducida

Después de 8 horas de transfección con moléculas Dbait en células Hela y cuatro irradiaciones con irradiación fraccionada de 0,5 Gy a intervalos de 2 horas (4x0,5 Gy), realizadas con rayos γ de una fuente de ¹³⁷Cs, se observó una reducción significativa de la supervivencia clonogénica en comparación con las células no transfectadas. Los resultados se proporcionan en la figura 2.1, en donde el Panel A proporciona la dependencia de la dosis del número de clones de supervivencia normalizada en presencia de Dbait32 y Dbait32H y el Panel B el número de clones de supervivencia normalizada en presencia de diferentes moléculas Dbait a 83 nM (concentración en medio de cultivo). El cultivo celular estaba en MEM suplementado con suero al 10 %. Como agente de transfección se usó Superfect (Qiagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La supervivencia clonogénica se estimó como el número de células tratadas que formaban colonias con respecto al número de células no tratadas.

El efecto depende de la duración y la naturaleza química de las moléculas Dbait de una manera dependiente de la dosis. En este ensayo, las moléculas Dbait de horquilla (Dbait32H, Dbait32-T4 y Dbait24H) y las moléculas Dbait bicatenarias lineales (Dbait64 y Dbait64L) redujeron significativamente la supervivencia clonogénica. Debe tenerse en cuenta que la molécula Dbait32C de tipo “dumbbell” que carece de extremos de ADNbc libres (protegida por enlazador de hexaetilenglicol en ambos extremos) no presentaba ningún efecto. La naturaleza química del bucle tampoco lo hacía (Dbait32H frente a Dbait32-T4). Estas observaciones indican que algunas de las moléculas Dbait pueden sensibilizar eficazmente a las células a la radiación ionizante en células cultivadas.

La figura 2.2 confirma las observaciones previas y proporciona datos adicionales de que las moléculas Dbait de 8 pb cortas o de una sola cadena no tenían ningún efecto. Además, demuestra que el efecto no era dependiente de la secuencia (Dbait32H frente a Dbait32Hc).

Tabla 2: supervivencia celular en células competentes para DNA-PK (MO59K) y células deficientes en DNA-PK (MO59J) después del tratamiento con radiación y Dbait. Las células se diluyeron y se cultivaron para formar colonias en matraces que después se irradiaron con 10 Gy y/o se transfectaron con Dbait32Hc 2 µg. Cuando los dos tratamientos se conjugaron, la irradiación se realizó 5 h después de la transfección. La supervivencia se calcula como el número de células que forman clones después del tratamiento dividido por el número de células que forman clones en la muestra no tratada. El valor medio y la desviación típica (entre paréntesis) se calcularon a partir de tres experimentos independientes

Línea celular	tratamiento		% de supervivencia
	Irradiación	Transfección	
MO59K	no	no	100 (4,41)
	10 Gy	no	9,83 (0,61)
	10 Gy	Dbait32Hc	3,47 (1,01)
MO59J	no	no	100 (2,97)
DNA-PK-null	10 Gy	no	3,97 (0,38)
	10 Gy	Dbait32Hc	3,98 (0,35)

El efecto de la transfección con Dbait32Hc sobre la supervivencia de las células DNA-PK de tipo silvestre y mutantes después de la irradiación y se estimó por formación de colonias. La supervivencia después de la irradiación se redujo del 9,83 % en células MO59K no transfectadas al 3,47 % en células transfectadas con Dbait32Hc. En la línea celular mutante DNA-PK-null correspondiente, MO59J, por el contrario, la supervivencia no se vio afectada por la transfección con Dbait32Hc. El nivel de supervivencia fue similar en la línea celular de tipo silvestre transfectada con Dbait32Hc e irradiada a la observada en las células mutantes DNA-PK-null después de irradiación únicamente

(3,47 % en comparación con 3,97 %). Esto sugiere que Dbait32Hc inhibe la reparación dependiente de DNA-PK en las células transfectadas de tipo silvestre.

3.2) Inhibición de la integración ilegítima de ADN exógeno por moléculas Dbait

Se sabe que la radiación ionizante mejora la integración ilegítima del ADN exógeno, un proceso denominado integración potenciada por radiación. Para este ensayo se usó un cultivo de células Hela. Las células se transfectaron durante 8 horas por 2 µg de un plásmido lineal que llevaba el gen codificante de resistencia a neomicina, y tres relaciones diferentes de ADN/Superfect (1:2, 1:5, 1:10). Durante el tiempo de transfección, las células se expusieron a diferentes protocolos de irradiación: sin irradiación, una sola irradiación de 1 Gy y 2 Gy, así como una irradiación de 2 Gy administrada por dosis fraccionadas de 0,5 Gy cada 2 horas (4x0,5 Gy). La integración del plásmido se supervisó por selección de células Neo^R cultivadas en un medio que contenía 0,6 mg/ml de G418. La integración del plásmido se potenció significativamente por el protocolo de irradiación fraccionada. Cuando se añadieron 2 µg de moléculas Dbait32H a la mezcla de transfección, se anuló la integración potenciada por la radiación (figura 2.3).

La figura 2.4 proporciona datos adicionales que muestran que únicamente las moléculas Dbait de 32 pb (Dbait32H y Dbait32Hc) eran capaces de inhibir la integración ilegítima potenciada por radiación de un plásmido circular que llevaba el gen codificante de resistencia a puromicina, mientras que las moléculas Dbait más cortas (Dbait16H, Dbait8H), monocatenarias o de tipo "dumbbell" (Dbait32ss y Dbait32C) no eran eficaces. Como controles se usaron Wortmann (Wort) y NU7026 (NU), que son inhibidores conocidos de PI3K (incluyendo DNA-PK).

Estos experimentos demostraron que la integración ilegítima potenciada por la radiación del ADN exógeno que requería proteínas Ku, DNA-PK y ATM (Nimura *et al.*, 2002), como era de esperar, se inhibe por moléculas Dbait 32-p de una manera independiente de la secuencia, ya que el mecanismo de acción de estas moléculas Dbait actúa a través del secuestro de las proteínas implicadas en una ruta NHEJ.

3.3) Persistencia de sitios de DSB después de irradiación en las células transfectadas por moléculas Dbait

Los sitios de DSB en los núcleos pueden supervisarse por inmunofluorescencia del anticuerpo de γ-H2AX que se une a H2AX fosforilada (una variante de la histona H2A). La mayor parte de los focos de γ-H2AX aparecen rápidamente después de la irradiación y desaparecieron según progresaba el proceso de reparación de DSB.

Los protocolos de transfección e irradiación fueron similares a los descritos anteriormente. Para la inmunodetección, las células se cultivaron en un cubreobjetos de superficie en placas Petri de 5 cm de diámetro y se transfectaron con moléculas Dbait32H-FITC 2 µg marcadas con FITC con Superfect (Qiagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuatro horas después de empezar la transfección, las células se irradiaron (2 Gy) y después se dejaron en reposo durante 2 horas en el medio a 37 °C. Después de 3 ciclos de lavado, las células se fijaron con PFA al 2 % durante 10 minutos. Después de un lavado adicional, se detectó la presencia de γ-H2AX con anticuerpo de conejo anti-γ-H2AX (4411-PC, Trevigen) diluido 1/100 en PBS 1x, BSA al 1 %. Las células se lavaron tres veces con PBS 1x y TritonX-100 al 0,5 %, y después se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos de cabra anti-conejo conjugados con rodamina diluidos 1/100 en PBS 1x, BSA al 1 %. Las células se visualizaron por microscopía de epifluorescencia.

La figura 2.5 muestra los resultados obtenidos con células HeLa transfectadas por moléculas Dbait32H-FITC fluorescentes 2 horas después de la irradiación con 2 Gy. Panel izquierdo: fluorescencia de Dbait32H-FITC (puntos y manchas brillantes) y focos de DSB detectados por inmunofluorescencia de anticuerpo de γ-H2AX en núcleos; Panel derecho: la misma imagen de núcleos con focos de DSB detectados por inmunofluorescencia de anticuerpo de γ-H2AX y contratinción DAPI. Las flechas en la esquina inferior izquierda muestran la ausencia de señal de Dbait32H-FITC y γ-H2AX en el núcleo. Las flechas en la esquina superior derecha muestran las señales de Dbait32H-FITC y γ-H2AX colocalizadas. Como se muestra en la figura 2.5, en las células HeLa transfectadas por moléculas Dbait32H-FITC persistían sitios de DSB dos horas después de la irradiación (2 Gy), como se muestra por el doble marcaje fluorescente con Dbait32H-FITC y el del anticuerpo de γ-H2AX. Debe tenerse en cuenta que los focos de DSB eran casi indetectables en las células que no se transfectaban eficazmente por Dbait32H-FITC. Estos datos sugieren que la reparación de DSB se veía perjudicada en las células transfectadas eficazmente con Dbait32H, mientras que la reparación del ADN era completa en las células peor transfectadas.

Se realizó transferencia de Western usando monoclonal de conejo anti-fosfoThr68-Chk2 (Cell Signalling Technology, Denver, Estados Unidos), monoclonal anti-β-actina clon AC-15 (Sigma, MS, Estados Unidos), anti-H2AX (Cell Signalling Technology, Denver, Estados Unidos) y un anticuerpo de ratón anti-fosfo-histona H2AX (Ser139) (Upstate, Tempcula, CA, Estados Unidos).

El panel superior de la figura 2.6 muestra el análisis de transferencia western de la forma fosforilada de la histona H2AX (γ-H2AX) en comparación con la fosforilación de la proteína H2AX total de la histona H2AX por PIKK. Se transfectaron células Hep2 durante 5 horas con diversas moléculas Dbait 32Hc, 24H, 16H y 8H durante 5 h o no se transfectaron. Se irradiaron al final de la transfección, se incubaron durante una hora y después se analizaron. Se

muestra que Dbait32Hc aumentaba en gran medida la forma fosforilada de H2AX (γ -H2AX) en comparación con el control (ambas células irradiadas, o ninguna). Otras moléculas Dbait más cortas tenían un efecto mucho menor o no tenían efecto.

5 Para investigar el efecto de Dbait sobre la formación y la pérdida de focos de γ -H2AX inducidos por radiación ionizante, se transfectaron Dbait32H-Cy3 en las células Hep2 por Superfect (Qiagen). Se irradiaron células Hep2 transfectadas o no transfectadas a 10 Gy. Las células se fijaron a diferentes tiempos (0 min, 30 min, 1 hora, 5 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas y 7 días). Se usó anticuerpo monoclonal de ratón primario para γ -H2AX (ser139) (Upstate, Tempcula, CA, Estados Unidos) en una dilución 1/500 y se incubó durante 2 horas a 0 °C, después se lavó con tampón PBS y se incubó con anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 anti-IgG de ratón (Molecular Probe, Eugene, OR, Estados Unidos) diluido 1/200 durante 1 hora en una sala oscura.

15 La cinética de la persistencia de los sitios de DSB se reveló por γ -H2AX en las células irradiadas por un citómetro de flujo FACScan (FACSalibur, Beckton-Dickinson, Estados Unidos). El panel inferior de la figura 2.6 muestra que el nivel de γ -H2AX permanecía elevado y prolongado en las células transfectadas con Dbait32H en comparación con los controles (células irradiadas pero no transfectadas o no tratadas). Este experimento indicó que Dbait32H retardaba sustancialmente la reparación de las DSB inducidas por radiación ionizante.

20 Ejemplo 4: efectos de moléculas Dbait en la línea celular GMA32 y su asociación con la irradiación o inhibidores mitóticos.

25 Se mantuvieron fibroblastos de hámster chino GMA32 permisivos a roturas de ADN en medio MEM (Gibco) complementado con piruvato sódico 1 mM, glutamina 2 mM, MEM 1x sin aminoácidos esenciales, penicilina/estreptomicina 1x y suero equino al 10 %. Típicamente, se sembraron de 2×10^5 a 4×10^5 células en medio sin antibióticos, en placas Petri de 5 cm de diámetro 24 horas antes de la transfección de diferentes moléculas Dbait (4,5 μ g) con Lipofectamine 2000 (Life Technologies) como agente de transfección (en una relación 1:3), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Al final de la transfección, las células se irradiaron (4 Gy) o se trataron con inhibidores mitóticos: nocodazol (200 nM), navelbina (100 nM) o taxol (200 nM).

30 Después de aproximadamente 16 horas, se retiró el fármaco y se dejó que se recuperaran las células. Se realizó irradiación celular con rayos γ a partir de una fuente de ^{137}Cs . Después de 24 horas de recuperación, las células se recogieron y se usaron para FACS, análisis de transferencia de Western o para determinar la clonogenicidad (supervivencia) y el efecto de cada tratamiento.

35 La figura 3.1 muestra el análisis FACS de las células GMA32 no tratadas, las células transfectadas individualmente o transfectadas con diferentes moléculas Dbait por Lipofectamine, pero sin irradiación adicional o tratamiento con inhibidor mitótico. La fase M1 representa el porcentaje de células en estadio sub-G1 indicativo de muerte celular. Se observó una muerte celular significativa únicamente en presencia de moléculas Dbait32 de doble cadena y Dbait32H de horquilla, mientras que Dbait16H de horquilla y Dbait32ss monocatenaria inducían una muerte celular intermedia y moderada, respectivamente. La Dbait8H de horquilla más corta no pudo desencadenar la muerte celular en comparación con el control (células transfectadas por Lipofectamine únicamente).

45 Los experimentos se realizaron con un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson). Se recogieron células, se suspendieron en 1 ml de tampón GM frío (glucosa 6,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM, NaH_2HPO_4 2 mM, KH_2PO_4 1 mM, EDTA 0,5 mM) y se almacenaron a 4 °C durante al menos 2 horas después de la adición de 3 ml de etanol al 100 % frío.

50 En ese estadio, las células finalmente se lavaron con PBS 1x y después se tiñeron durante 30 minutos a temperatura ambiente en solución de PI (50 μ g/ml de yoduro de propidio, 25 μ g/ml de RNasa A en tampón PBS 1x). Se analizaron 10.000 acontecimientos con el software Cellquest y se seleccionaron agregados celulares. Se puntuó el porcentaje de células con un contenido de ADN de sub-G1.

55 En las mismas condiciones, se realizó la inmunodetección de focos de DSB de γ -H2AX fosforilada en la serina 139 por marcaje con γ -H2AX (puntos o manchas brillantes en los núcleos) en las células GMA32 no tratadas, las células transfectadas individualmente o transfectadas con diferentes moléculas Dbait por Lipofectamine. La contrateñición de las membranas celulares y los núcleos se consiguieron por FITC-DiOC6 y DAPI. Se observaron efectos similares de las moléculas Dbait (Figura 3.2). Este experimento muestra que tanto la Dbait32 bicatenaria como la Dbait32H de horquilla pueden provocar eficazmente una respuesta celular similar a la que se produciría si se hubieran producido lesiones de ADN en los núcleos. Esto proporciona una evidencia visual de que estas moléculas Dbait pueden usarse para atrapar proteínas implicadas en la reparación de DSB a través de la ruta NHEJ.

60 Para la inmunodetección, las células se cultivaron en cubreobjetos en placas Petri de 5 cm de diámetro, 24 horas antes de la transfección con diferentes moléculas Dbait. Un día después de la transfección, se añadió FITC-DiOC6 (Molecular probes) en el medio durante 5 minutos a 37 °C (para contrateñir las membranas). Después de 3 ciclos de lavado, las células se fijaron con PFA al 4 % durante 20 minutos.

65

Después de un lavado adicional, se detectó γ -H2AX fosforilada en la serina 139 (γ -H2AX) con anticuerpo de conejo anti- γ -H2AX (4411-PC, Trevigen) diluido 1/100 en PBS 1x, BSA al 1 %. Las células se lavaron tres veces con PBS 1x, TritonX-100 al 0,5 % y después se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos de cabra anti-conejo Alexa 594 (Molecular Probes) diluidos 1/100 en PBS 1x, BSA al 1 %. Las células se visualizaron por microscopía de epifluorescencia.

Se realizaron experimentos adicionales para buscar indicios de señalización de lesiones en el ADN. La proteína p53 es una proteína bien conocida importante en la mediación de la señalización de las lesiones del ADN y en la coordinación de las respuestas apropiadas (reparación de ADN, apoptosis, etc.) mediante el cambio de su estado de fosforilación. En particular, la fosforilación del resto de serina 15 está implicada en la interacción con la proteína MDM2 que actúa como un control de retroalimentación. Por lo tanto, se evaluó el estado de fosforilación de la serina 15 de p53 por transferencia de Western. La figura 3.3 muestra que la serina 15 de p53 estaba altamente fosforilada cuando las células se habían transfectado con moléculas Dbait32 bicatenarias o Dbait32H de horquilla, mientras que Dbait16H de horquilla más corta inducía una fosforilación moderada. Ni la Dbait8H más corta ni las moléculas Dbait32ss monocatenarias podían inducir una fosforilación significativa en la serina 15 de la proteína p53.

Este experimento proporciona indicios adicionales de que la presencia de Dbait32 bicatenaria y Dbait32H de horquilla en células GMA32 se detectaba como lesiones en el ADN e inducía respuestas de señalización al transductor tales como la fosforilación de la proteína p53, probablemente a través de una ruta de activación de ATM.

Para el análisis de transferencia de Western, se lisaron células en tampón de Laemmli. Se resolvieron cantidades iguales de lisados en geles de poliacrilamida al 12 %. Se transfirieron proteínas a membranas de nitrocelulosa, que se bloquearon con leche desnatada al 5 % (1 hora) antes de la incubación durante una noche con anticuerpo anti-p53Ser15 (9284, Cell Signaling) diluido 500 veces en tampón TBST (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1 %) que contenía leche desnatada al 5 %. Después, las manchas de transferencia se incubaron con anticuerpos secundarios de cabra anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (P0448, Dako) diluidos 1/5000 en TBST. Se detectaron complejos de proteína-anticuerpo por la quimioluminiscencia aumentada (RPN2106 ECL, Amersham).

El efecto de radiosensibilización y quimiosensibilización de las moléculas Dbait en células GMA32 se evaluó por ensayo de clonogenicidad (supervivencia clonal). Para el ensayo de clonogenicidad, se realizaron diluciones seriadas después del recuento de las células para sembrar placas Petri de 5 cm con diferentes cantidades de células. El número de células variaba de 100-200 (células de control) a 3000 (células transfectadas y/o tratadas). Diez días después, las células (que formaban clones) se fijaron con paraformaldehído al 4 % (20 minutos), después se tiñeron con azul de metileno (15 minutos) y se puntuó el número de clones en cada placa (por triplicado).

La Figura 3.4 muestra que se observaba radiosensibilización a la irradiación de 4 Gy en células GMA32 transfectadas con moléculas Dbait32 bicatenarias o Dbait32H de horquilla. Además, también se observó quimiosensibilización en el caso de las células GMA32 transfectadas con moléculas Dbait32 bicatenarias o Dbait32H de horquilla cuando se trataron por inhibidores mitóticos (nocodazol 200 nM, navelbina 100 nM (vinorelbina) o taxol 200 nM (paclitaxel)). Estos fármacos se conocen como potentes inhibidores de la polimerización o despolimerización de microtúbulos. Dbait32 y Dbait32H pudieron potenciar la actividad citotóxica de estos inhibidores mitóticos.

Ejemplo 5: radiosensibilización del tratamiento de tumores humanos xenoinjertados en ratones desnudos

La actividad *in vivo* de moléculas Dbait en asociación con radioterapia se evaluó usando ratones desnudos xenoinjertados con tumores humanos por inyección subcutánea de líneas celulares radiorresistentes (Hep2 derivada de carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello, HNSCC) o fragmentos de tumor (obtenidos previamente por inyección subcutánea de las líneas celulares U87 derivadas de glioblastoma).

Las investigaciones principalmente se realizaron en los ratones con xenoinjertos de tumores HNSCC humanos radiorresistentes para establecer la prueba de concepto *in vivo*. Se realizó irradiación con rayos γ desde una fuente de ^{137}Cs con la protección apropiada de los ratones para realizar una irradiación localizada de los tumores. Las condiciones de ensayo típicas consisten en la inyección intratumoral de una preparación apropiada de 1 nmol de moléculas Dbait con agentes de transfección (dendrímico catiónico (Superfect, Qiagene), dioctadecilamidoglicil-espermina (DOGS, Polyplus Transfection) y polietilenimina (PEI, Polyplus Transfection) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, 5 horas antes de la irradiación. Se administró una dosis total de 30 Gy en 5 semanas: i) 3 x 2 Gy/semana (aproximadamente una cada dos días); ii) 5 Gy/semana; iii) 15 Gy/2 semanas.

El tamaño del tumor se midió 2-3 veces por semana. Como control del tratamiento de irradiación sin Dbait se usó el tratamiento por irradiación e inyección intratumoral de medio MEM (el tampón de dilución de Dbait). Se calculó el volumen tumoral ($V=2 \times a \times b^2$, en donde a=longitud, b=anchura). La relación de volumen medido a tiempo t con respecto al volumen inicial (V_t/V_i) se usó como indicador de la progresión tumoral. Se realizó un seguimiento de los ratones durante un periodo de hasta 100 días. Se ensayaron al menos 4 series independientes de seis animales.

Los resultados se ilustran por la figura 4.1 (Panel A: conjunto no tratado (n=38, Panel B: conjunto de control con 20 µl de medio de cultivo (MEM) + irradiación de 3 x 2 Gy/semana (n=30); Panel C: el conjunto con 1 nmol (20 µg) de Dbait32H + irradiación 3 x 2 Gy/semana (n=35).

5 Se administraron MEM o Dbait32H por inyección intratumoral 5 horas antes de la irradiación. La dosis de irradiación fraccionada (2 Gy) se administró uno de cada dos días, tres veces por semana. El tratamiento duró 5 semanas con un total de irradiación de 30 Gy. Los puntos representan el transcurso de tiempo del volumen del tumor de cada ratón. Las líneas continuas son el mejor ajuste polinomial. El Panel D muestra un gráfico de Kaplan-Meier de todos los ratones de los cuales el aumento del volumen tumoral (V_t/V_i) < 5.

10 Se ha acumulado una cantidad significativa de datos en el conjunto de Dbait32H con irradiación de 3 x 2Gy/semana (panel C, n=35) que claramente mostró radiosensibilización en comparación con los conjuntos de control: no tratado (panel A, n=38), MEM + 3 x 2 Gy (panel B, n=30). El ensayo estadístico de Man y Whitney proporcionó un valor de p = 0,00067 para el conjunto de Dbait32H + 3 x 2Gy frente a MEM + 3 x 2Gy. Se observó la misma tendencia en un gráfico de Kaplan-Meier de ratones con un volumen tumoral (V_t/V_i < 5) más pequeño que cinco veces el volumen inicial (panel D).

20 Posteriormente se realizaron investigaciones adicionales en ratones con xenoinjertos de tumores HNSCC humano, U87, LU1205 y SK28 para definir características moleculares de moléculas Dbait y un protocolo óptimo para la actividad *in vivo*. Los datos obtenidos de la cohorte estudiada fueron coherentes con las características moleculares de las moléculas Dbait observadas en estudios bioquímicos e *in vitro* (véanse los ejemplos 2, 3 y 4). Además, se demostró que la radiosensibilización es dependiente del tiempo de permanencia entre la inyección intratumoral de Dbait32H y la radiación ionizante: 5 horas >> 1 hora.

25 También se observó radiosensibilización en ratones xenoinjertados con tumores de glioblastoma humano. El glioblastoma es el máximo grado de tumor cerebral y se caracteriza por su progresión extraordinariamente agresiva con un resultado fatal rápido y resistencia a la radio y quimioterapia. En primer lugar, se inyectaron 2-3 millones de células U87 derivadas de glioblastoma humano por vía subcutánea en ratones desnudos. Después se recogió el tumor injertado y se usó para sembrar posteriormente otros ratones desnudos por trasplante subcutáneo de un tumor de glioblastoma de aproximadamente 8 mm³.

30 La Tabla 3.1 muestra los datos de una serie piloto de tumores de glioblastoma humano xenoinjertados en ratones desnudos. El 50 % de los ratones del conjunto que recibió Dbait32H (1 nmol) por inyección intratumoral e irradiación (1 x 15 Gy/semana o 3 x 5 Gy/semana, seguido de una semana de reposo, y después el segundo ciclo de tratamiento, siendo la dosis total de radiación ionizante de 30 Gy) tuvieron un volumen tumoral <4 cm³ el día 25 después del inicio del tratamiento, mientras que el 100 % de los ratones de los conjuntos de control (no tratado o irradiado e inyectado con solución salina (PBS)) tuvieron un volumen tumoral que excedía ampliamente los 4 cm³, y se sacrificaron antes del final del ensayo de acuerdo con la normativa actual sobre ética animal antes de finalizar el tratamiento.

40 Tabla 3.1: Ensayo de radiosensibilización de glioblastoma humano xenoinjertado en ratones desnudos por Dbait32H (1 nmol/inyección intratumoral). Se usaron dos protocolos de irradiación (5 horas después de la inyección intratumoral): 1 x 15 Gy/semana, o 3 x 5 Gy/semana, seguido de una semana de reposo, y el segundo ciclo de tratamiento. La dosis de irradiación total fue de 30 Gy. Los grupos de control fueron los grupos no tratados o los grupos que recibieron inyección de solución salina (PBS)

Grupos de ensayo (Glioblastoma xenoinjertado)	Número de ratones en los que el volumen Tumoral < 4 cm ³ el día 25 (6 ratones por grupo)
No tratado	0/6
PBS + 1 x 15 Gy/semana	0/6
Dbait32H + 1 x 15 Gy/semana	3/6
PBS + 3 x 5 Gy/semana	0/6
Dbait32H + 3 x 5 Gy/semana	3/6

50 Basándose en estos datos *in vivo* alentadores que proporcionaron indicios de que las moléculas Dbait pueden mejorar eficazmente la eficacia de la radioterapia, se diseñaron y se realizaron otros experimentos para proporcionar datos adicionales relacionados con el uso de las moléculas Dbait como agente adyuvante para sensibilizar frente a la radioterapia, y de esta forma reforzar la prueba de principio del enfoque de DNA bait en la terapia contra el cáncer.

55 La figura 4.2 muestra la distribución de Dbait32H marcado con cianina 3 en tumores de xenoinjerto Hep2 (línea celular HNSCC) en ratones desnudos. Se inyectaron 20 µg de Dbait32H-Cy3 formulado con Superfect (agente de transfección) en un tumor Hep2 de 1,5 cm³. Los ratones se sacrificaron 6 horas después de la inyección. Los tumores se recogieron y se crioseccionaron para el análisis sin fijación. Para la tinción de núcleos se usó DAPI. La fluorescencia de la cianina 3 muestra que las moléculas Dbait32H-Cy3 se distribuían en el tejido tumoral desde los vasos capilares sanguíneos, y se localizaron en el núcleo celular.

La figura 4.3 muestra otro experimento en tumores xenoinjertados Hep2 como se describe en la figura 4.1. El crecimiento tumoral se supervisó durante y después del tratamiento en cuatro grupos de 10 animales con diferentes tratamientos (no tratado, tratado con Dbait32H solo, tratado por irradiación sola y Dbait32H e irradiación combinadas). Se indica el crecimiento del tumor individual para cada animal. El protocolo de tratamiento fue el mismo que se describió en la figura 4.1. El experimento empezó cuando el volumen de los tumores Hep2 alcanzó 150-200 mm³. Para cada sesión de tratamiento, se inyectaron 20 µg de Dbait32H formulado con polietilenimina (PEI, Polyplus Transfection, Strasbourg, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en el tumor 5 horas antes de la irradiación con 2 Gy. El crecimiento tumoral se redujo en gran medida en el grupo tratado por Dbait32H e irradiación combinadas en comparación con los grupos tratados por irradiación o Dbait32H solo.

La figura 4.4 muestra la representación de Kaplan-Meier de la supervivencia de ratones desnudos con tumores Hep2 xenoinjertados por vía subcutánea. Por razones éticas, los animales se sacrificaron cuando sus tumores alcanzaron 2 cm³. Este criterio de valoración se usó como muerte en el análisis de supervivencia. El protocolo de tratamiento se describió en la figura 4.3. Se incluyeron los cinco grupos: no tratado, transfectado de forma simulada e irradiado, tratado por irradiación y cantidad creciente de Dbait32H combinadas (20, 60 y 120 µg/sesión). El número de animales para cada grupo se indica en la tabla 3.2. Se observó un claro efecto dependiente de la dosis en los grupos tratados por Dbait32H e irradiación de 2 Gy. Las imágenes de tumores son representativas de los grupos (no tratado, tratado con 20 y 60 µg de Dbait32H/sesión asociada con irradiación de 2 Gy) que se tomaron 15 días después del inicio del tratamiento, al final del tratamiento (35 días) y 13 días después del final del tratamiento (35+13 días). Proporcionaron una clara comparación visual del efecto beneficioso del tratamiento combinado de Dbait32H e irradiación.

La figura 4.5 muestra el análisis histológico de tumores Hep2 xenoinjertados en la mitad del tratamiento (7 sesiones). Se recogieron tumores 20 días después del inicio de diversos protocolos de tratamiento como se indica en la figura 4.3. Se fijaron en formalina y se tiñeron secciones de tejido con hematoxilina, eosina y azafrán. Se analizaron dos tumores de cada protocolo de tratamiento por microscopía. Se observó un aumento de la necrosis y apoptosis en los tumores tratados con Dbait32H e irradiación combinadas en comparación con los tumores tratados con irradiación sola.

La figura 4.6 muestra imágenes de RMN de tumores Hep2 xenoinjertados en la mitad del tratamiento (7 sesiones). Se mostraron tres imágenes de sección transversal representativas con tumor no tratado, tumor tratado por irradiación y mediante la combinación de Dbait32H (20 µg/sesión) e irradiación (2 Gy/sesión). El área necrótica fue más importante en el tumor tratado por Dbait32H e irradiación que en el tratado por irradiación sola. Esto es coherente con el análisis citológico de los tumores (véase la figura 4.5).

La figura 4.7 muestra la representación de Kaplan-Meier de la supervivencia de ratones desnudos xenoinjertados por vía subcutánea por tumores Hep2, U87, LU1205 y SK28 y sus grupos de control (no tratado, tratado por irradiación sola). El protocolo de Hep2 se describió en la figura 4.3. Se trataron otros tumores por un protocolo modificado en el que se aplicaba una irradiación fraccionada de 5 Gy en tres días consecutivos, seguido de cuatro días de reposo, y el tratamiento se repetía una vez. La dosis de irradiación total (6 x 5 Gy) es igual a la del protocolo usado para tratar el tumor Hep2 (15 x 2 Gy).

El resultado beneficioso de la combinación de Dbait32H e irradiación se observó en los cuatro tumores humanos xenoinjertados. Como mecanismo subyacente de acción de las moléculas Dbait y la ruta NHEJ ubicua en todas las células, se prevé que esto sea cierto también para otros tumores con diferente histología.

Se realizaron análisis descriptivos de la respuesta tumoral para cada tratamiento y cada tipo de tumor. El día 1 fue el día de la primera sesión de tratamiento. Se realizó un seguimiento de todos los animales durante al menos 150 días o hasta su sacrificio ético. La mediana del tiempo de vida se estimó de acuerdo con el método de Kaplan-Meier. El valor de TGD (retraso del crecimiento tumoral) se calculó restando el tiempo que tardaba en cuadruplicarse el volumen tumoral medio del grupo de control de los tiempos que tardaban en cuadruplicarse el volumen del tumor de ratones individuales en cada grupo tratado. El valor medio de TGD se calculó para grupo tratado usando las mediciones individuales.

Se evaluaron curvas de supervivencia globales por estimaciones de Kaplan-Meier y se compararon usando el ensayo Log Rank no paramétrico, ya que los datos no siguen una distribución normal. El análisis usó el software S-Plus versión 6.2 (MathSoft Inc., Seattle, WA) y statEL (ad Science, París, Francia). Primero se realizó un Log Rank global para todos los grupos con el mismo tipo de tumor. Los tratamientos con Dbait se compararon con el control tratado de forma simulada. El número de animales (n), el riesgo relativo (RR) y el valor de P se presentan en la Tabla 3.2. Todos los ensayos se consideraron significativos a un nivel de significación de 0,05.

La Tabla 3.2 resume parte de los datos descritos anteriormente y proporciona la comparación de la supervivencia de animales con xenoinjertos tratados por diferentes protocolos (diversas moléculas Dbait32 + irradiación frente a irradiación + inyección simulada) en tres líneas de células tumorales humanas xenoinjertadas por vía subcutánea en ratones desnudos. Además, se demuestra que la secuencia de las moléculas Dbait no tiene importancia como se demuestra por el resultado similar de Dbait32Hc en comparación con Dbait32H. También muestra que Dbait32ss monocatenario era inactivo incluso a alta dosis

Línea celular	Irradiación	Dbait	Concentración de Dbait	Número de ratones	Número de ratones curados***	Mediana del tiempo de supervivencia (días)	**Riesgo relativo (valor de P)	**Media TGD	**STD TGD	**Intervalo TGD	**Media TGD
Hep2	-	-	-	21		49	C	0	3,8	-5 ; 12	100
Hep2	-	32H	15 x 20 µg (1 nmol)	10		55	0,62 (p<0,24)	7	6,7	-3 ; 17	168
Hep2	-	32ss	15 x 120 µg (12 nmol)	12		46	0,71 (p<0,29)	6	4,9	0 ; 19	156
Hep2	15 x 2 Gy	Simulado	-	17		61	C*	12	14,2	-3 ; 45	217
Hep2	15 x 2 Gy	32H	15 x 20 µg (1 nmol)	15		93	0,42 (p<9,55.10 ⁻³)	49	26,6	8 ; 134	561
Hep2	15 x 2 Gy	32Hc	15 x 20 µg (1 nmol)	11		94	0,55 (p<0,14)	>56	41,1	6 ; 139	629
Hep2	15 x 2 Gy	32H	15 x 60 µg (3 nmol)	20	3	129	0,28 (p<4,16.10 ⁻⁴)	>83	50,7	-3 ; 139	880
Hep2	15 x 2 Gy	32Hc	15 x 60 µg (3 nmol)	23	3	123	0,36 (p< 1,2.10 ⁻³)	>59	40,7	0 ; 139	652
Hep2	15 x 2 Gy	32H	15 x 20 µg (6 nmol)	20	4	150	0,18 (p<4.10 ⁻⁶)	>91	44,4	1 ; 139	952
Hep2	15 x 2 Gy	32ss	15 x 120 µg (12 nmol)	12		80	0,57(p<0,15)	29	19,8	3 ; 59	374
LU	-	-	-	21		24	C	0	2,8	-4 ; 4	100
LU	6 x 5 Gy	Simulado	-	30		61	C*	>22	29,2	-7 ; 140	348
LU	6 x 5 Gy	32Hc	6 x 60 µg (3 nmol)	17	1	80	0,45 (p<1,03.10 ⁻²)	27	13,8	-7 ; 58	400
SK	-	-	-	21		54	C	0	8,2	-19 ; 14	100
SK	6 x 5 Gy	Simulado	-	17		86	C*	17	19,5	-3 ; 83	187
SK	6 x 5 Gy	32H	6 x 60 µg (3 nmol)	10	2	176	0,22 (P<1,27.10 ⁻⁴)	64	44,9	-3 ; 156	422
SK	6 x 5 Gy	32Hc	6 x 60 µg (3 nmol)	22	3	135	0,29(p<1,89.10 ⁻³)	32	26,9	-8 ; 100	261
SK	6 x 5 Gy	8H	6 x 60 µg (3 nmol)	8		76	0,68 (p<0,46)	19	10,9	0 ; 40	194

Debe tenerse en cuenta que Dbait32Hc carece de CpG en su secuencia para evitar el efecto de la reacción inmunológica debida a inmunoestimulaciones mediadas por receptores de tipo Toll bien conocidas.

En conclusión, la reducción significativa en el crecimiento tumoral de tumores radiorresistentes humanos (IHep2, U87 y SK28) y un tumor radiosensible (LU1205) xenoinjertado en ratones desnudos proporciona indicios de que las moléculas Dbait pueden radiosensibilizar eficazmente estos tumores agresivos al efecto de la radioterapia. De esta manera, se ha conseguido la prueba de concepto del enfoque de DNA bait *in vivo*.

Ejemplo 6: quimiosensibilización del tratamiento de tumores digestivos inducidos en ratones transgénicos K-Ras^{V12G} x Apc^{1638N}

Se eligió un modelo de tumor de ratón endógeno para evaluar la capacidad de moléculas Dbait de sensibilizar frente a la quimioterapia anticancerosa. Para este fin, se usaron ratones transgénicos que llevaban mutaciones K-Ras^{V12G} y Apc^{1638N}. Se obtuvieron cruzando dos ratones transgénicos: uno lleva el mutante K-Ras^{V12G} bajo el control del promotor de vilina de ratón (pVill/K-Ras^{V12G}) (Janssen *et al.*, 2002), el otro contiene la mutación Apc^{1638N} en un alelo (Fodde *et al.*, 1994). Los ratones transgénicos con mutaciones pVill/K-Ras^{V12G} x Apc^{1638N} desarrollaron tumores espontáneos en el tracto digestivo a la edad de aproximadamente 5 meses y murieron rápidamente.

Se trataron a la edad media de 12 semanas mediante una combinación de quimioterapia (5FU + CPT11) y Dbait32H frente a quimioterapia sola, de acuerdo con el protocolo mostrado en la figura 5.1 panel A. El protocolo incluye tres ciclos de tratamiento.

Cada ciclo consiste en una inyección intraperitoneal de 0,6 mg de 5FU y 0,6 mg de CPT11, junto con 0,1 mg de Dbait32H por administración oral, tres veces por semana, seguido de una semana de reposo.

5FU (5 fluorouracilo, Teva) se preparó en solución de NaCl al 0,9 % a la concentración de 50 mg/ml. CPT11/Irinotecán (Campto, Aventis) se preparó en solución de NaCl al 0,9 % a la concentración de 20 mg/ml. El estado de salud y la supervivencia de los ratones se supervisaron hasta la muerte. No se observó indicación clínica de un efecto tóxico adicional debido a las moléculas Dbait.

Los resultados se muestran en la figura 5.1. Panel A: protocolo de tratamiento para tres grupos/conjuntos de los ratones transgénicos K-Ras^{V12G} x Apc^{1638N} a la edad media de 12 semanas: el grupo de control (no tratado), el grupo tratado por 5FU + CPT11 y el grupo tratado por 5FU + CPT11 y Dbait32H. Se realizaron tres ciclos de tratamiento. Cada ciclo consiste en una inyección intraperitoneal de 0,6 mg de 5FU y 0,6 mg de CPT11, junto con 0,1 mg de Dbait32H por administración oral, tres veces por semana, seguido de una semana de reposo. El número de ratones implicados en cada grupo se indica entre paréntesis. El criterio de valoración es el tiempo de supervivencia; Panel B: gráfico de Kaplan-Meier de curvas de supervivencia de los tres grupos; Panel C: la mediana del tiempo de supervivencia de tres grupos como se muestra en el panel B.

A pesar de que era una cohorte reducida, se observó una mejoría del tiempo de supervivencia en el conjunto que recibió la combinación de quimioterapia (5FU + 11CPT) y Dbait32H (mediana de supervivencia=226 días, valor de p=0,2) en comparación con la de la quimioterapia sola (173 días) y el grupo de control (175 días) (paneles B y C).

Actualmente se están realizando ensayos adicionales para aumentar la cohorte de 5FU + CPT11 + Dbait32H y 5FU + CPT11, para aumentar el significado estadístico.

Se sacrificó una serie de los ratones dos semanas después del final del tratamiento (a la edad media de 18 semanas) para evaluar el número medio de tumores por animal. El intestino se examinó por macroscopía y examen histológico (tinción estándar con Hematoxilina-Eosina-Azafrán).

Los resultados se proporcionan en la figura 5.2. El número de animales en cada grupo se indicó entre paréntesis. Todos los ratones se sacrificaron dos semanas (semana 18) después del protocolo mostrado en la figura 5.1, panel A. El número medio del conjunto de control (grupo no tratado, n=101) es 30,8/animal.

Los dos exámenes mostraron consistentemente una reducción significativa del número de tumores (> 30 %) en el conjunto que recibió la combinación de 5FU + CPT11 y Dbait32H (n=8) en comparación con el conjunto que recibió quimioterapia sola (n=7) (figura 5.2). Debe tenerse en cuenta que el número medio del conjunto de control (grupo no tratado, n=101) es 30,8/animal.

Se analizaron muestras de tumor preparadas a partir de animales tratados con moléculas Dbait marcadas con fluoresceína (Dbait32H-FITC) y 5FU + CPT11 usando métodos de tinción de inmunofluorescencia. Los focos marcados con γ -H2AX se tiñeron conjuntamente con moléculas Dbait fluorescentes, lo cual recuerda el descubrimiento *in vitro* (véase el ejemplo 3.3 y 4). La figura 5.3 muestra un ensayo adicional en el que un ratón transgénico K-Ras^{V12G} x Apc^{1638N} de 18 semanas de edad se trató consecutivamente por quimioterapia (5FU + CPT11) y Dbait32H-FITC durante tres días y se sacrificó dos horas después del último tratamiento como se indica en el panel A. Se recogió el intestino y se lavó por PBS. Después se extrajeron muestras de los tejidos tumorales y

se congelaron a -80°C . Para el análisis, se prepararon muestras histológicas de $5\ \mu\text{m}$ a partir de los tejidos tumorales congelados mediante un criostato. Los focos de reparación de ADN se detectaron por inmunofluorescencia con anticuerpo policlonal de conejo anti- $\gamma\text{-H2AX}$ (Trevigen) diluido 1/500 en PBS, y después con anticuerpo de cabra anti-conejo marcado con cianina 3 (Jackson) diluido 1/200 en PBS. Las muestras también se contratiñeron por DAPI. Las muestras se visualizaron por microscopía de epifluorescencia. Se descubrió que la fluorescencia de Dbait32H-FITC se diseminaba heterogéneamente en los tejidos tumorales (epitelio y estroma entre estructuras glandulares) y tenía una localización preferente en el núcleo (figura 5.3, panel B, izquierda). Se observó un patrón similar para los sitios $\gamma\text{-H2AX}$ (figura 5.3, panel B, derecho). Casi siempre se observaron señales de Dbait32H-FITC y $\gamma\text{-H2AX}$ colocalizadas.

En conclusión, la mejora de la supervivencia y la reducción del número de tumores por animal muestra consistentemente coherente la evidencia de quimiosensibilización al tratamiento de tumores digestivos en los ratones transgénicos que llevan mutaciones K-Ras^{V12G} x Apc^{1638N} mediante moléculas Dbait (Dbait32H). Un análisis profundo de los tejidos tumorales en los animales tratados proporciona indicios de que las moléculas Dbait interfieren con el proceso de reparación del ADN.

Debe indicarse que, en este estudio, la administración oral de moléculas Dbait32H no incluía ningún agente de transfección.

En resumen, los datos bioquímicos e *in vitro* son claramente coherentes con un mecanismo de acción de las moléculas Dbait mediante interferencia con la reparación de DSB por la ruta NHEJ y la ruta de transducción de señales de reparación provocada por una lesión directa o indirecta en el ADN (radiación ionizante o agentes quimioterapéuticos). Debido a la naturaleza independiente de la secuencia de la ruta NHEJ (Jackson, 2002, Barnes, 2001, Downs y Jackson, 2004), no hay limitación sobre las secuencias y la longitud de las moléculas Dbait aparte de una longitud mínima (aproximadamente 32 pb). Los estudios *in vivo* han confirmado una radio- y quimiosensibilización eficaz de los tumores en ratones por moléculas Dbait. Considerados conjuntamente, todos los datos han proporcionado consistentemente pruebas de concepto del enfoque de DNA Bait, descritas las características moleculares de las moléculas Dbait.

Referencias

Barnes, D. E. Non-homologous end joining as a mechanism of DNA repair. *Curr. Biol.* (2001)11, R455-7.

Belenkov AI, Paiement JP, Panasci LC, Monia BP, Chow TY. An antisense oligonucleotide targeted to human Ku80 messenger RNA sensitizes M059K malignant glioma cells to ionizing radiation, bleomycin, and etoposide but not DNA cross-linking agents. *Cancer Res.* (2002), 62,5888-96.

Bouton., S.: Kyle. S.: Durkacz. B. W. Mechanisms of enhancement of cytotoxicity in etoposide and ionizing radiation-treated cells by the protein kinase inhibitor wortmannin. *Eur. J Cancer* (2000), 36, 535-41.

Cantor, C. R.; Warshaw, M. M.; Shapiro, H. Oligonucleotide interactions. III. Conformational differences between deoxy- and ribonucleoside phosphates *Biopolymers* (1970), 9, 1059-77.

Cary, R. B.; Peterson, S. R.; Wang, J. T.; Bear, D. G.; Bradbury, E. M. & Chen, D. J. DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94, 4267-4272.

Downs, J. A.; Jackson, S. P A means to a DNA end: The many roles of Ku. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* (2004), 5,367-78.

Durant, S.; Karran, P. Vanillins--a novel family of DNA-PK inhibitors. *Nucleic Acids Res.* (2003), 31,5501-12.

Fodde, R.; Edelmann, W.; Yang, K.; van Leeuwen, C; Carlson, C; Renault, B.; Breukel, C; Alt, E.; Lipkin, M.; Khan, P. M. A targeted chain-termination mutation in the mouse Ape gene results in multiple intestinal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1994), 91,8969-73.

Jackson, S. P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis.* (2002), 23, 687-96.

Janssen, K. P.; el-Marjou, F.; Pinto, D.; Sastre, X.; Rouillard, D.; Fouquet, C; Soussi, T.; Louvard, D.; Robine, S. Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* (2002), 123,492-504.

Kim, C. H.; Park, S. J.; Lee, S. H.; A targeted inhibition of DNA-dependent protein kinase sensitizes breast cancer cells following ionizing radiation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2002), 303,753-9.

Lee, H.; Sun, D.; Lerner, J. M.; Wu, F. S. The tumor suppressor p53 can reduce stable transfection in the presence of irradiation. *J Biomed. Sci.* (1999), 6,285-92.

- Li, S.; Takeda, Y.; Wragg, S.; Barrett, J.; Phillips, A.; Dynan, W. S. Modification of the ionizing radiation response in living cells by an scFv against the DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acid Res.* (2003) 31,5848-57.
- 5 Li, G. C.; He, F.; Shao, X.; Urano, M.; Shen, L.; Kim, D.; Borrelli, M.; Leibel, S. A.; Gutin, P. H.; Ling, C. C. Adenovirus-mediated heat-activated antisense Ku70 expression radiosensitizes tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* (2003b), 63,3268-74.
- 10 Maacke, H.; Jost, K.; Opitz, S.; Miska, S.; Yuan, Y.; Hasselbach, L.; Luttes, J.; Kalthoff, H.; Sturzbecher, H. W. DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* (2000). 19,2791-5.
- Mallya, S. M.; Sikpi, M. O. Evidence of the involvement of p53 in gamma-radiation-induced DNA repair in human lymphoblasts. *Int. J. Radiat. Biol.* (1998), 74,231-8.
- 15 Marangoni, E.; Bay, J. O.; Verrelle, P.; Bourhis, J. Transfer of gene for modification of the response to radiotherapy. *Cancer Radiother.* (2000), 4,175-80.
- 20 Marangoni, E.; Foray, N.; O'Driscoll, M.; Douc-Rasy, S.; Bernier, J.; Bourhis, J.; Jeggo, P. A Ku80 fragment with dominant negative activity imparts a radiosensitive phenotype to CHO-K1 cells. *Nucleic Acid Res.* (2000a), 28,4778-82.
- 25 Marangoni, E.; Le Romancer, M.; Foray, N.; Muller, C.; Douc-Rasy, S.; Vaganay, S.; Abdulkarim, B.; Barrois, M.; Calsou, P.; Bernier, J.; Salles, B.; Bourhis, J. Transfer of Ku80 RNA antisense decreases the radioresistance of human fibroblasts. *Cancer Gene Ther.* (2000b), 7,339-46.
- Martensson, S.; Hammarsten, O. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: structural requirements for kinase activity by DNA ends. *J. Biol. Chem.* (2002), 277,3020-29.
- 30 Mimori, T.; Hardin, J. A. Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J. Biol. Chem.* (1986), 261,10375-10379.
- Nimura, Y.; Ismail, S. M.; Kurimas, A.; Chen, D. J.; Stevens, C. W. DNA-PK and ATM are required for radiation-enhanced integration. *Radiat. Environ. Health Phys.* (2002), 157,562-7.
- 35 O'Driscoll, M.; Jeggo, P. Immunological disorders and DNA repair. *Mutat. Res.* (2002), 509, 109-26.
- Ohnishi, T.; Taki, T.; Hiraga, S.; Arita, N.; Morita, T. *In vitro* and *in vivo* potentiation of radiosensitivity of malignant gliomas by antisense inhibition of the RAD51 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1998), 245,319-24.
- 40 Pang, D. L.; Yoo, S. H.; Dynan, W. S.; Jung, M.; Dritschilo, A. Ku proteins join DNA fragments as shown by atomic force microscopy. *Cancer Res.* (1997), 57, 1412-5.
- 45 Peng, Y.; Zhang, Q.; Nagasawa, H.; Okayasu, R.; Liber, H. L.; Bedford, J. S. Silencing expression of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase by small interfering RNA sensitizes human cells for radiation-induced chromosome damage, cell killing, and mutation. *Cancer Res.* (2002), 62,6400-4.
- Rassool, F. V. DNA double strand breaks (DSB) and non-homologous end joining (NHEJ) pathways in human leukemia. *Cancer Lett.* (2003), 193,1-9.
- 50 Roddam, P. L.; Rollinson, S.; O'Driscoll, M.; Jeggo, P. A.; Jack, A.; Morgan, G. J. Genetic variants of NHEJ DNA ligase IV can affect the risk of developing multiple myeloma, a tumour characterised by aberrant class switch recombination. *J. Med. Genet.* (2002) 39,900-5.
- 55 Sak, A.; Stuschke, M.; Wurm, R.; Schroeder, G.; Sinn, B.; Wolf, G.; Budach, V. Selective inactivation of DNA-dependent protein kinase with antisense oligodeoxynucleotides: consequences for the rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks and radiosensitivity of human cancer cell lines. *Cancer Res.* (2002), 62,6621-24.
- 60 Stevens, C. W.; Zeng, M.; Cerniglia, G. J. Ionizing radiation greatly improves gene transfer efficiency in mammalian cells. *Hum. Gene Ther.* (1996), 7,1727-34.
- Stevens, C. W.; Stamato, T. D.; Mauldin, S. K.; Getts, R. C.; Zeng, M.; Cerniglia, G. J. Radiation-induced recombination is dependent on KU80. *Radiat. Environ. Health Phys.* (1999), 151,408-13.
- 65 Stevens, C. W.; Cerniglia, G. J.; Giandomenico, A. R.; Koch, C. J. DNA damaging agents improve stable gene transfer efficiency in mammalian cells. *Radiat. Oncol. Invest.* (1998), 6, 1-9.

Verrelle, P.; Bourhis, J. Modulation de la réponse cellulaire aux radiations ionisantes: vers de nouvelles cibles moléculaires. *Cancer Radiother.* (1997), 1, 484-93.

5 Walker, J. R.; Corpina, R. A.; Goldberg, J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* (2001), 412,607-14.

Yoo, S. H.; Dynan, W. S. Characterization of the RNA binding properties of Ku protein. *Biochemistry* (1998), 37,1336-43.

10 Yoo, S. H.; Kimzey, A.; Dynan, W. S. Photocross-linking of an oriented DNA repair complex. Ku bound at a single DNA end. *J. Biol. Chem.* (1999), 274,20034-9.

15 Yoo, S. H.; Dynan, W. S. Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acid Res.* (1999), 27,4679-86.

Zhao, J. K.; Wang, J. T.; Chen, D. J.; Peterson, S. R.; Trehwella, J. The solution structure of the DNA double-stranded break repair protein Ku and its complex with DNA: a neutron contrast variation study. *Biochemistry* (1999), 3, 2152-9.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT CURIE
Centre National de la Recherche Scientifique MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE INSTITUT
25 NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

<120> Dbait y usos de las mismas

<130> B0515WO

30 <150> US 11/524.528

<151> 21-09-2006

<160> 27

35 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 32

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dbait32

45 <220>

<221> misc_feature

<223> /note="en los extremos 5' y 3' de la cadena complementaria, los tres últimos nucleótidos con esqueleto de fosforotioato"

50

<220>

<221> modified_base

<222> (1)..(3)

<223> mod_base= esqueleto de fosforotioato

55

<220>

<221> modified_base

<222> (30)..(32)

<223> mod_base=esqueleto de fosforotioato

60

<400> 1

acgcacgggt gttgggtcgt ttgtcggat ct 32

5
 <210> 2
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Dbait 32H-po

15
 <220>
 <221> stem_loop
 <222> (1)..(32)

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> bucle=enlazador de hexaetilenglicol

25
 <400> 2
 acgcacgggt gttgggtcgt ttgtcggat ct 32

30
 <210> 3
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> Dbait32H

40
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> /note="en el extremo 3' de la cadena complementaria, los tres últimos nucleótidos con esqueleto de fosforotioato "

45
 <220>
 <221> stem_loop
 <222> (1)..(32)

50
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> mod_base=esqueleto de fosforotioato

55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> bucle=enlazador de hexaetilenglicol

60
 <400> 3
 acgcacgggt gttgggtcgt ttgtcggat ct 32

65
 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70
 <220>
 <223> Dbait24H

75
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> /note="en el extremo 3' de la cadena complementaria, los tres últimos nucleótidos con esqueleto de fosforotioato"

80
 <220>
 <221> stem_loop
 <222> (1)..(24)

ES 2 633 652 T3

5
<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(3)
<223> mod_base=esqueleto de fosforotioato

10
<220>
<221> misc_feature
<222> (24)..(24)
<223> bucle=enlazador de hexaetilenglicol

15
<400> 4
acgcacgggt gttgggtcgt ttgt 24

20
<210> 5
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> Dbait16H

30
<220>
<221> misc_feature
<223> /note="en el extremo 3' de la cadena complementaria, los tres últimos nucleótidos con esqueleto de fosforotioato"

35
<220>
<221> stem_loop
<222> (1)..(16)

40
<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(3)
<223> mod_base=esqueleto de fosforotioato

45
<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> bucle= enlazador de hexaetilenglicol

50
<400> 5
acgcacgggt gttggg 16

55
<210> 6
<211> 8
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60
<220>
<223> Dbait8H

65
<220>
<221> misc_feature
<223> /note: "en el extremo 3' de la cadena complementaria, los tres últimos nucleótidos con esqueleto de fosforotioato"

60
<220>
<221> stem_loop
<222> (1)..(8)

65
<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(3)
<223> mod_base=esqueleto de fosforotioato

ES 2 633 652 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> bucle= enlazador de hexaetilenglicol
 5
 <400> 6
 acgcacgg 8
 <210> 7
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Dbait32ss
 15
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> mod_base=esqueleto de fosforotioato
 20
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (30)..(32)
 <223> mod_base=esqueleto de fosforotioato
 25
 <400> 7
 acgcacgggt gttgggtcgt ttgttcggat ct 32
 30
 <210> 8
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Dbait32-T4
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> /note="en el extremo 3' de la cadena complementaria, los tres últimos nucleótidos con esqueleto de
 fosforotioato"
 40
 <220>
 <221> stem_loop
 <222> (1)..(32)
 45
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> mod_base=esqueleto de fosforotioato
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (33)..(36)
 <223> bucle
 55
 <400> 8
 acgcacgggt gttgggtcgt ttgttcggat ctttttagat ccgaacaaac gacccaacac 60
 ccgtgcgt 68
 60
 <210> 9
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 633 652 T3

<220>
 <223> Dbait32C

5

<220>

<221> stem_loop

<222> (1)..(32)

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> bucle=enlazador de hexaetilenglicol

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> bucle=enlazador de hexaetilenglicol

20

<400> 9

acgcacgggt gttgggtcgt ttgtcggat ct 32

25

<210> 10

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<221> misc_feature

<223> /note= "el último nucleótido en el extremo 3' de la cadena complementaria está unido con enlace 3'-3'"

35

<220>

<221> stem_loop

<222> (1)..(32)

40

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> bucle=enlazador de hexaetilenglicol

45

<400> 10

gctaggcttg ttgctgggt ttaggcaca gc 32

50

<210> 11

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Dbait32-NH2

60

<220>

<221> misc_feature

<223> /note="el nucleótido en el extremo 5' de la cadena complementaria está unido a un grupo NH2"

65

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> mod_base= esqueleto de fosforioato

<220>
 <221> misc_binding
 <222> (32)..(32)
 <223> enlazador= NH2
 5
 <400> 11
 acgcacgggt gttgggtcgt ttgtcggat ct 32
 <210> 12
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Dbait32H-FITC
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> /note= "los tres últimos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria con esqueleto de
 20 fosforotioato"
 <220>
 <221> stem_loop
 <222> (1)..(32)
 25
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> mod_base=esqueleto de fosforotioato
 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> bucle= enlazador de hexaetilenglicol
 35
 <220>
 <221> misc-binding
 <222> (32)..(32)
 <223> enlazador=FITC
 40
 <400> 12
 acgcacgggt gttgggtcgt ttgtcggat ct 32
 <210> 13
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Dbait32H-Cy3
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> /note= "los tres últimos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria con esqueleto de
 55 fosforotioato"
 <220>
 <221> stem_loop
 <222> (1)..(32)
 60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> bucle= enlazador de hexaetilenglicol
 65

<220>
 <221> misc-binding
 <222> (32)..(32)
 <223> enlazador= cianina3
 5
 <400> 13
 acgcacgggt gttgggtcgt ttgtcggat ct 32
 <210> 14
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Dbait32H-Biot
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> /note= "los tres últimos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria con esqueleto de
 20 fosforotioato"
 <220>
 <221> stem_loop
 <222> (1)..(32)
 25
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> mod_base= esqueleto de fosforotioato
 30
 <220>
 <221> misc-binding
 <222> (32)..(32)
 <223> enlazador= biotina
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> bucle= enlazador de hexaetilenglicol
 40
 <400> 14
 acgcacgggt gttgggtcgt ttgtcggat ct 32
 <210> 15
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Dbait32Ha
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> /note= en el extremo 3' de la cadena complementaria, los tres últimos nucleótidos con esqueleto de
 55 fosforotioato"
 <220>
 <221> stem_loop
 <222> (1)..(32)
 60
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> mod_base=esqueleto de fosforotioato
 65

ES 2 633 652 T3

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> bucle= enlazador de hexaetilenglicol

<400> 15
gctaggctcg ttggtggct tgcagtggc ac 32

10 <210> 16
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Dbait32Hb

20 <220>
<221> misc_feature
<223> /note="en el extremo 3' de la cadena complementaria, los tres últimos nucleótidos con esqueleto de fosforotioato"

25 <220>
<221> stem_loop
<222> (1)..(32)

30 <220>
<221> modified_base
<222> (1)..(3)
<223> mod_base=esqueleto de fosforotioato

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> bucle= enlazador de hexaetilenglicol

<400> 16
gctaggcttg ttgctgggt ttaggcaca gc 32

40 <210> 17
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Dbait32Hc

50 <220>
<221> misc_feature
<223> bucle=enlazador de hexaetilenglicol

55 <220>
<221> misc_feature
<223> /note= "en el extremo 3' de la cadena complementaria, los tres últimos nucleótidos con esqueleto de fosforotioato"

60 <220>
<221> modified_base
<222> (1)..(3)
<223> mod_base= esqueleto de fosforotioato

65 <400> 17
gctgtgccca caaccagca aacaagccta ga 32

ES 2 633 652 T3

5
 <210> 18
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Dbait32Hd

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> /note= "en el extremo 3' de la cadena complementaria, los tres últimos nucleótidos con esqueleto de fosforotioato"

20
 <220>
 <221> stem_loop
 <222> (1)..(32)

25
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> mod_base= esqueleto de fosforotioato

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> bucle= enlazador de hexaetilenglicol

35
 <400> 18
 gctaggctctg ttggtggct tgcagtggc ac 32

40
 <210> 19
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Dbait32HC-3'imp

50
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> /note="últimos 3 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria con enlace metilfosfonato"

55
 <220>
 <221> stem_loop
 <222> (1)..(32)

60
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> bucle= enlazador de hexaetilenglicol

65
 <400> 19
 gctgtgcccc caaccagca aacaagccta ga 32

70
 <210> 20
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75
 <220>
 <223> Dbait32HC-5'3'imp

80
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> /note= "los tres últimos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria con enlace metilfosfonato"

<220>
 <221> stem_loop
 <222> (1)..(32)

5 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> mod_base= enlace metilfosfonato

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> bucle=enlazador de hexaetilenglicol

15 <400> 20
 gctgtgccca caaccagca aacaagccta ga 32

 <210> 21
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Dbait32Hcss-po

25 <400> 21
 gctgtgccca caaccagca aacaagccta ga 32

 <210> 22
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> DbaitBHc-Cy3

35 <220>
 <221> misc_feature
 <223> /note="el nucleótido en el extremo 5' de la cadena complementaria unido a cianina 3"

40 <220>
 <221> misc_feature
 <223> /note="los tres últimos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria con esqueleto de fosforotioato"

45 <220>
 <221> stem_loop
 <222> (1)..(8)

50 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> mod_base= esqueleto de fosforotioato

55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> bucle= enlazador de hexaetilenglicol

60 <400> 22
 gctgtgca 8

 <210> 23
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

65

ES 2 633 652 T3

<220>
<223> Dbait32Hc-Cy3

5 <220>
<221> misc_feature
<223> /note= "los tres últimos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria con esqueleto de fosforotioato"

10 <220>
<221> misc_feature
<223> /note= "el nucleótido en el extremo 5' de la cadena complementaria unido a Cianina 3"

15 <220>
<221> stem_loop
<222> (1)..(32)

20 <220>
<221> modified_base
<222> (1)..(3)
<223> mod_base= esqueleto de fosforotioato

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> bucle= enlazador de hexaetilenglicol

<400> 23
gctgtgccca caaccagca aacaagccta ga 32

30 <210> 24
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Dbait32Hc-Cy5

40 <220>
<221> misc_feature
<223> /note= "los tres últimos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria con esqueleto de fosforotioato"

45 <220>
<221> misc_feature
<223> /note= "el nucleótido en el extremo 5' de la cadena complementaria unido a Cianina-5"

50 <220>
<221> stem_loop
<222> (1)..(32)

55 <220>
<221> modified_base
<222> (1)..(3)
<223> mod_base= esqueleto de fosforotioato

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> bucle= enlazador de hexaetilenglicol

<400> 24
gctgtgccca caaccagca aacaagccta ga 32

ES 2 633 652 T3

<210> 25
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Dbait32Hd-FITC
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <223> /note= "los tres últimos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria con esqueleto de fosforotioato"
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <223> /note= "el segundo nucleótido del extremo 5' de la cadena complementaria unido a FITC"
 <220>
 20 <221> stem_loop
 <222> (1)..(32)
 <220>
 25 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> mod_base= esqueleto de fosforotioato
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (32)..(32)
 <223> bucle= enlazador de hexaetilenglicol
 <400> 25
 gctaggctcg ttggtggct ttgcagtggc ac 32
 35 <210> 26
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Dbait64
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <223> /note= "los tres últimos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria con esqueleto de fosforotioato"
 <220>
 50 <221> misc_feature
 <223> /note= "los tres nucleótidos en el extremo 5' de la cadena complementaria con esqueleto de fosforotioato"
 <220>
 55 <221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> mod_base=esqueleto de fosforotioato
 <220>
 60 <221> modified_base
 <222> (62)..(64)
 <223> mod_base=esqueleto de fosforotioato
 <400> 26

acgcacgggt gttgggtcgt ttgttcggat ctacgcacgg tcgtttgttc ggtgttggcg 60
 atct 64

ES 2 633 652 T3

<210> 27
<211> 63
<212> ADN
<213> Artificial
5
<220>
<223> Dbait64-L
10
<220>
<221> misc_feature
<223> /note= "los tres últimos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria con esqueleto de fosforotioato"
15
<220>
<221> misc_feature
<223> /note= "los tres nucleótidos en el extremo 5' de la cadena complementaria con esqueleto de fosforotioato"
20
<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(3)
<223> mod_base= enlazador de hexaetilenglicol
25
<220>
<221> repeat_region
<222> (32)..(33)
<223> rpt_type= enlazador de hexaetilenglicol
30
<220>
<221> modified_base
<222> (61)..(63)
<223> mod_base= enlazador de hexaetilenglicol
<400> 27
acgcacgggt gttgggtcgt ttgttcggat cacgcacggg cgtttgttcg gtggtggcga 60
tct 63
35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico, en donde dicha molécula comprende una parte de doble cadena de 32 a 100 pb, tiene al menos un extremo libre, carece de CpG, tiene menos de un 70 % de identidad de secuencia con cualquier gen del genoma humano, comprende uno o varios fosforotioatos o nucleótidos con esqueleto de metilfosfonato en el extremo de cada cadena o al menos en el extremo 3' de la cadena, y en donde dicha molécula es un sustrato para unirse al menos a la proteína Ku implicada en la ruta NHEJ de reparación de roturas de doble cadena DSB, en donde la parte de doble cadena tiene la secuencia de las moléculas Dbait32Hc (SEQ ID No 17), Dbait32Hc-3'mp (SEQ ID No 19), Dbait32Hc-5'3'mp (SEQ ID No 20), Dbait32Hc-Cy3 (SEQ ID No 23) y Dbait32Hc-Cy5 (SEQ ID No 24).
- 10 2. La molécula de la reivindicación 1, seleccionada del grupo que consiste en Dbait32Hc (SEQ ID No 17), Dbait32Hc-3'mp (SEQ ID No 19), Dbait32Hc-5'3'mp (SEQ ID No 20), Dbait32Hc-Cy3 (SEQ ID NO: 23) y Dbait32Hc-Cy5 (SEQ ID No 24).
- 15 3. La molécula de la reivindicación 1, seleccionada del grupo que consiste en Dbait32Hc (SEQ ID No 17), Dbait32Hc-3'mp (SEQ ID No 19) y Dbait32Hc-5'3'mp (SEQ ID No 20).
- 20 4. La molécula de la reivindicación 1, que es Dbait32Hc (SEQ ID No 17).
- 25 5. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, preferentemente adecuado para vía oral o para inyección intravenosa, intratumoral o subcutánea, o para inyección o infusión intracraneal o intraarterial, o para administración tópica.
- 30 6. Producto farmacéutico que comprende una molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un agente químico anticanceroso que produce lesiones en el ADN que puede causar directa o indirectamente roturas de doble cadena de ADN, como una preparación combinada para uso para tratar cánceres.
- 35 7. Producto farmacéutico para el uso de la reivindicación 6, en donde la molécula se va a administrar antes o junto con el agente químico.
- 40 8. Una molécula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso como un medicamento para el tratamiento de cánceres mediante el aumento de la sensibilidad tumoral a terapias anticancerosas que producen lesiones en el ADN o para uso como un medicamento para tratar cánceres a usar en combinación con una terapia anticancerosa que produce lesiones en el ADN preferentemente seleccionada entre radioterapia y quimioterapia.
- 45 9. La molécula para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la molécula se va a administrar antes de la radioterapia o antes o junto con quimioterapia.
10. La molécula para uso de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 9, en donde el cáncer se selecciona entre cáncer del SNC, de cabeza y cuello, colorrectal, hepático, del tracto gastrointestinal, del tracto genitourinario, de pulmón, de piel, de mama y del cuello uterino.
11. La molécula para uso de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 10, en donde la molécula se va a administrar por vía oral o por inyección intravenosa, intratumoral o subcutánea, o mediante inyección o infusión intracraneal o intraarterial, o es para administración tópica.

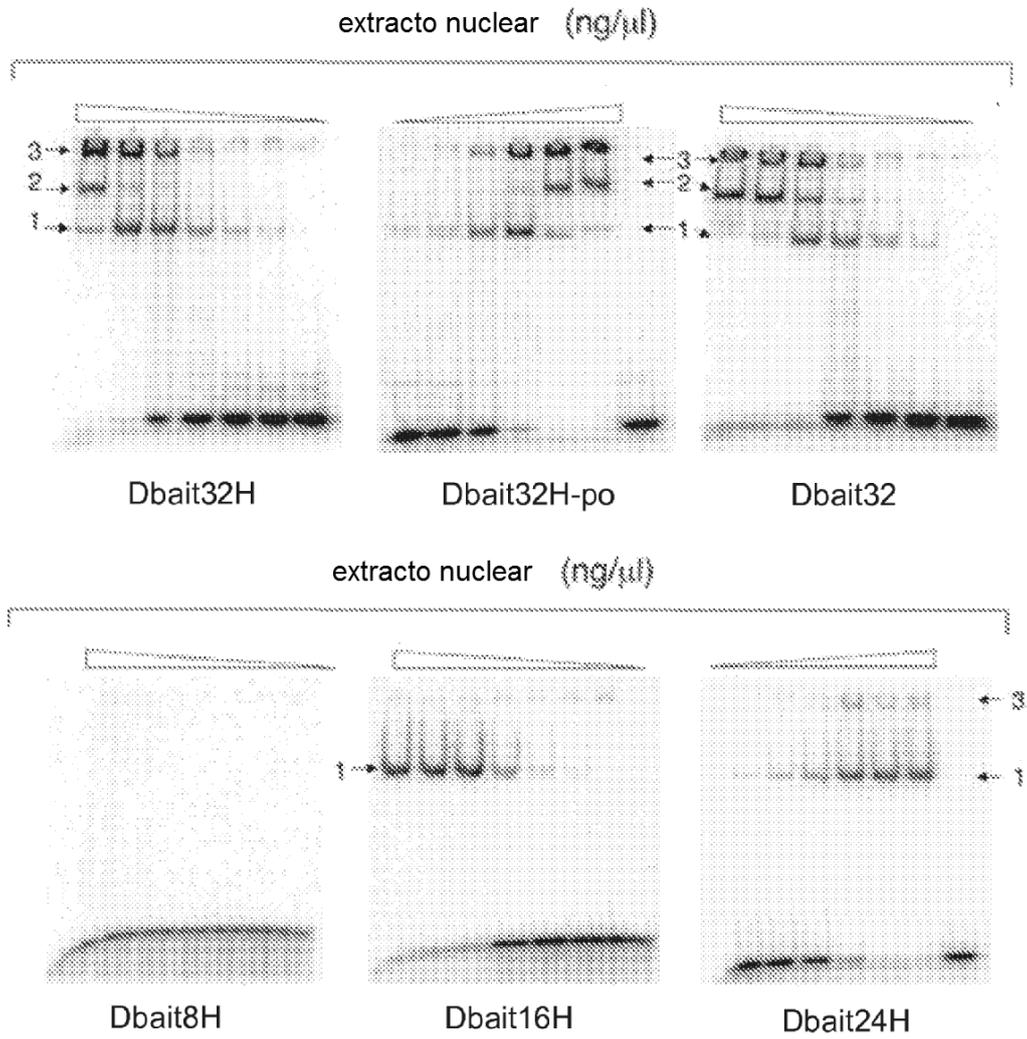


Figura 1.1

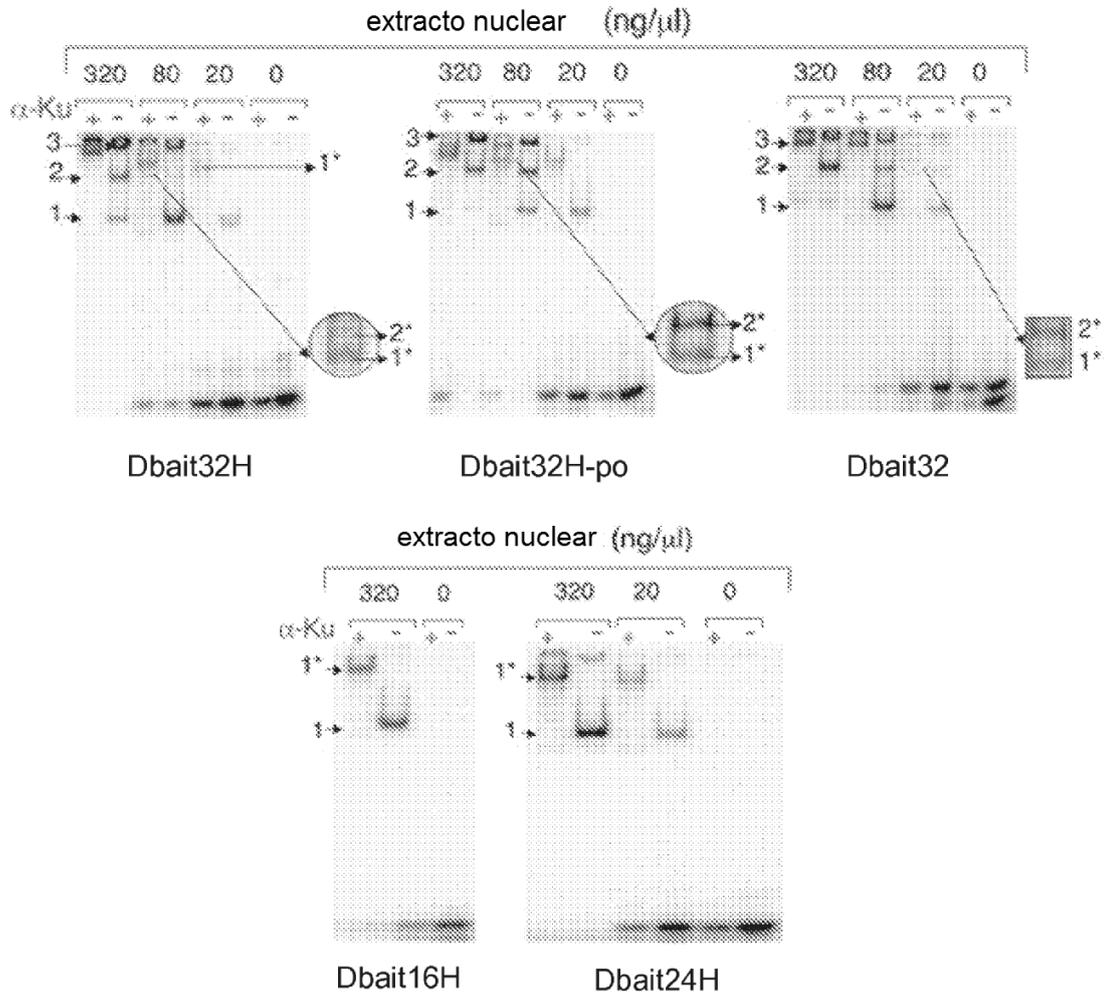


Figura 1.2

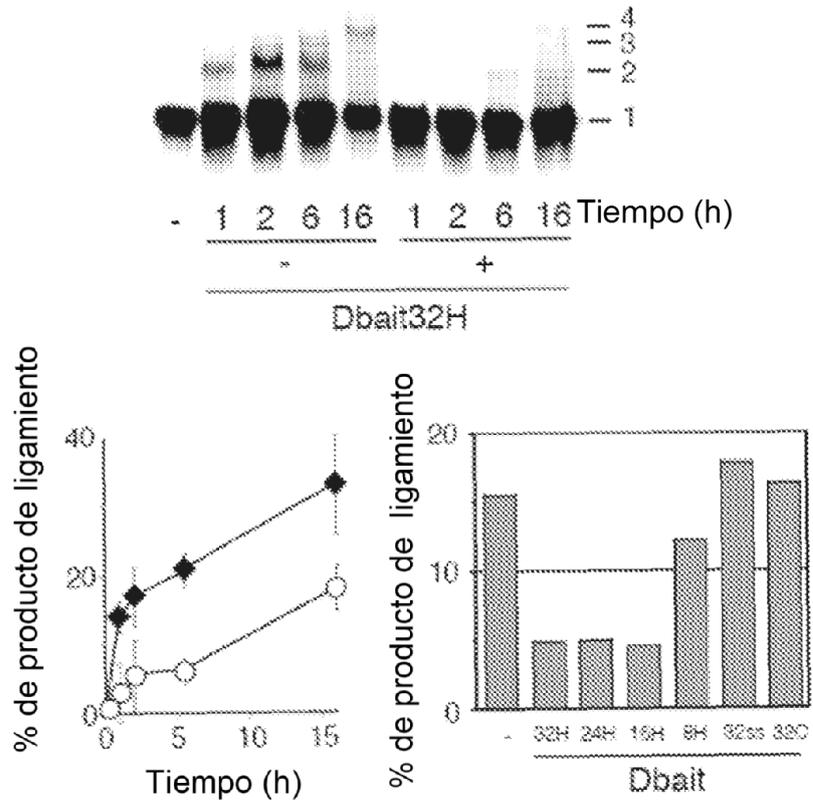


Figura 1.3

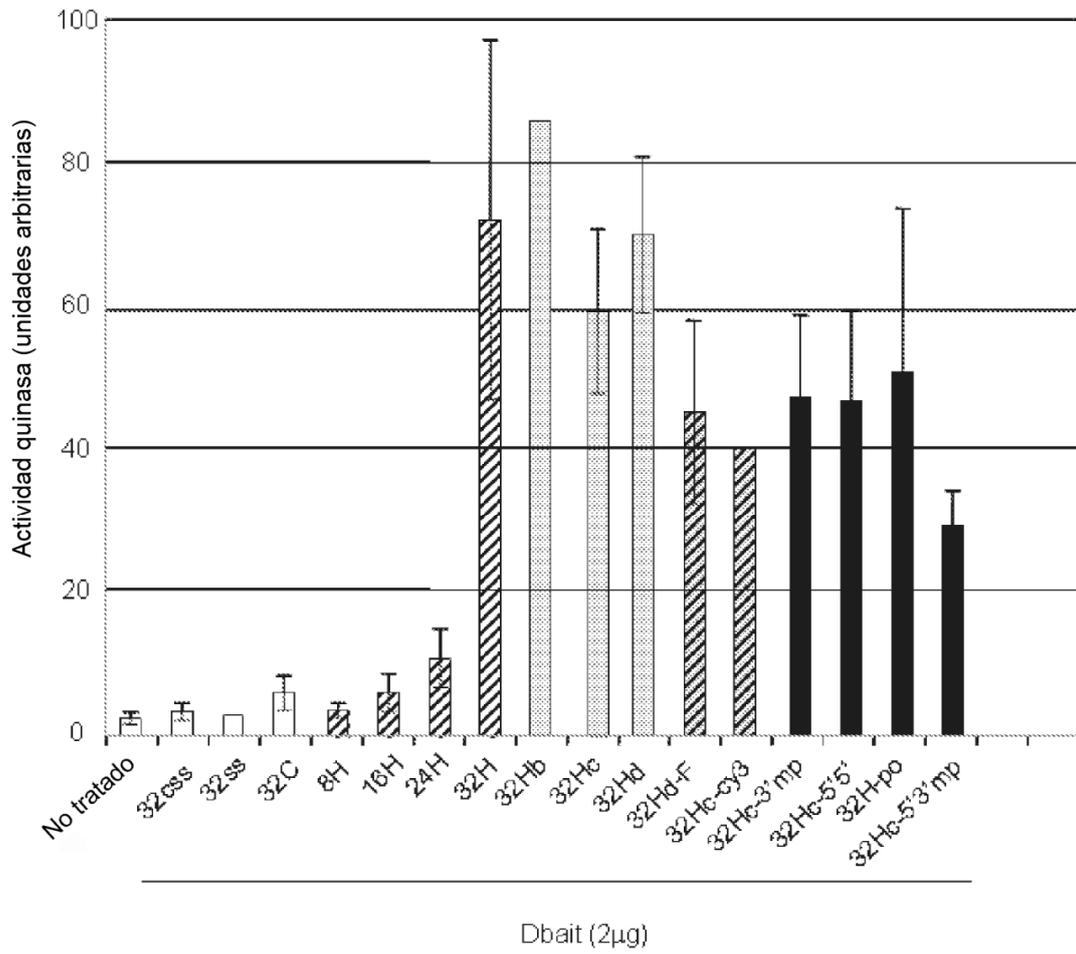


Figura 1.4

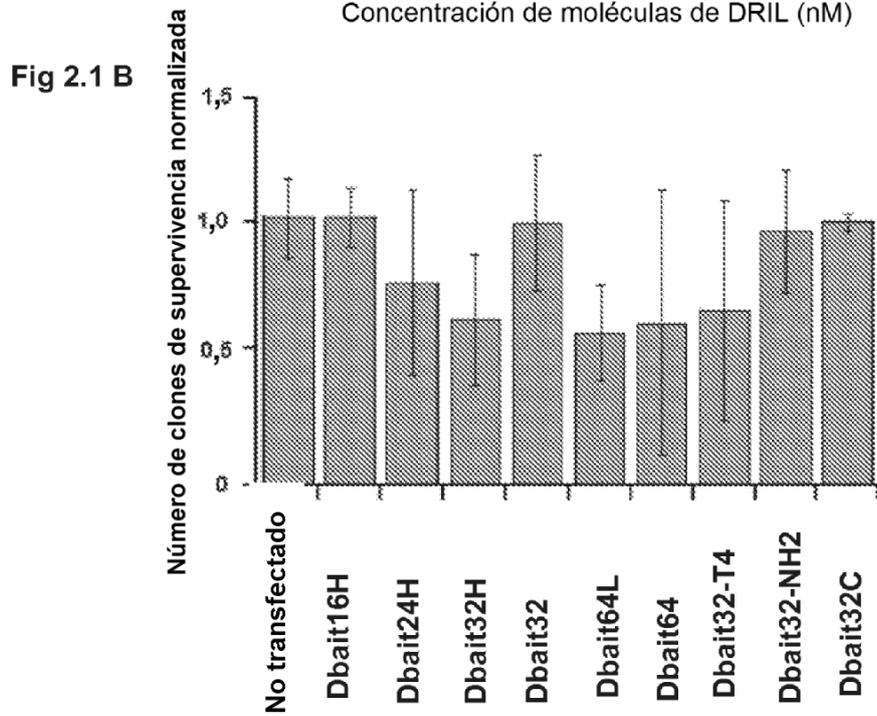
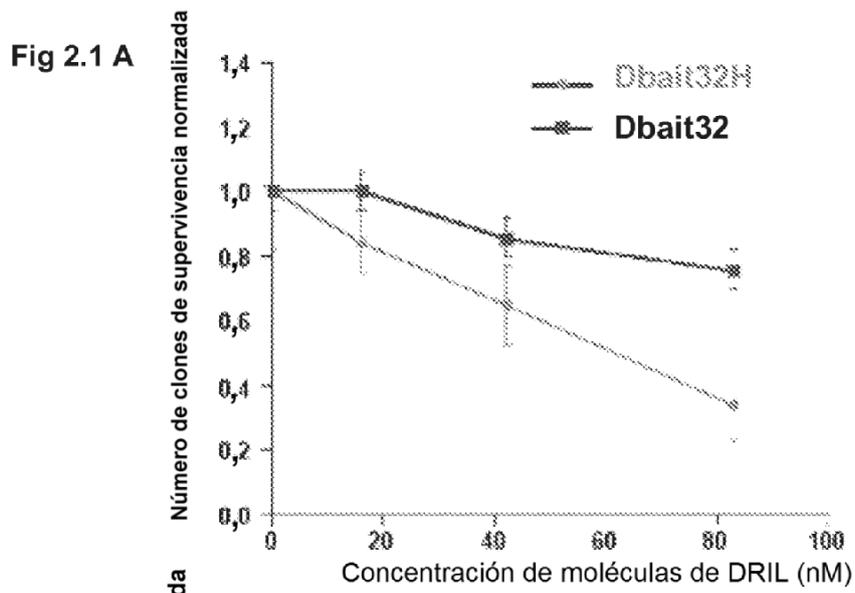


Figura 2.1

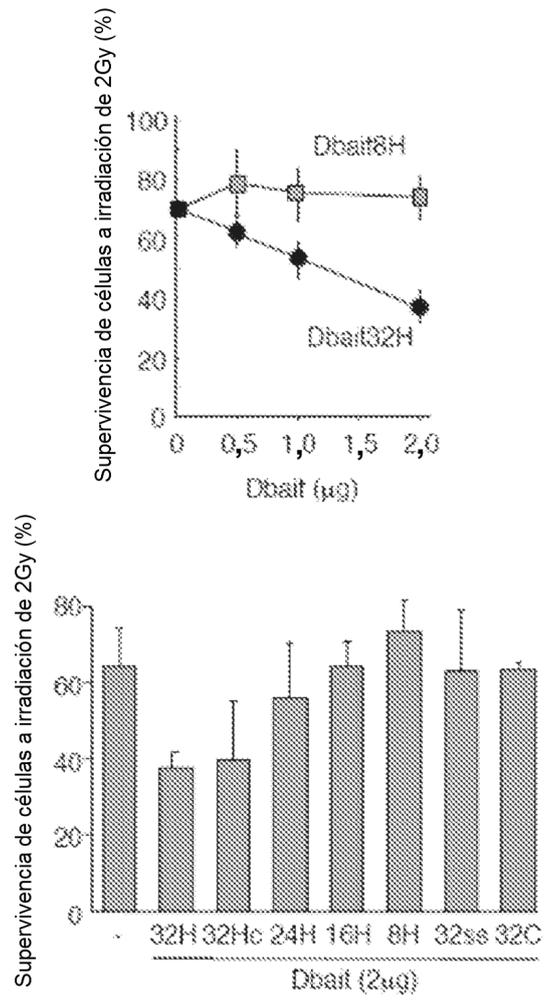


Figura 2.2

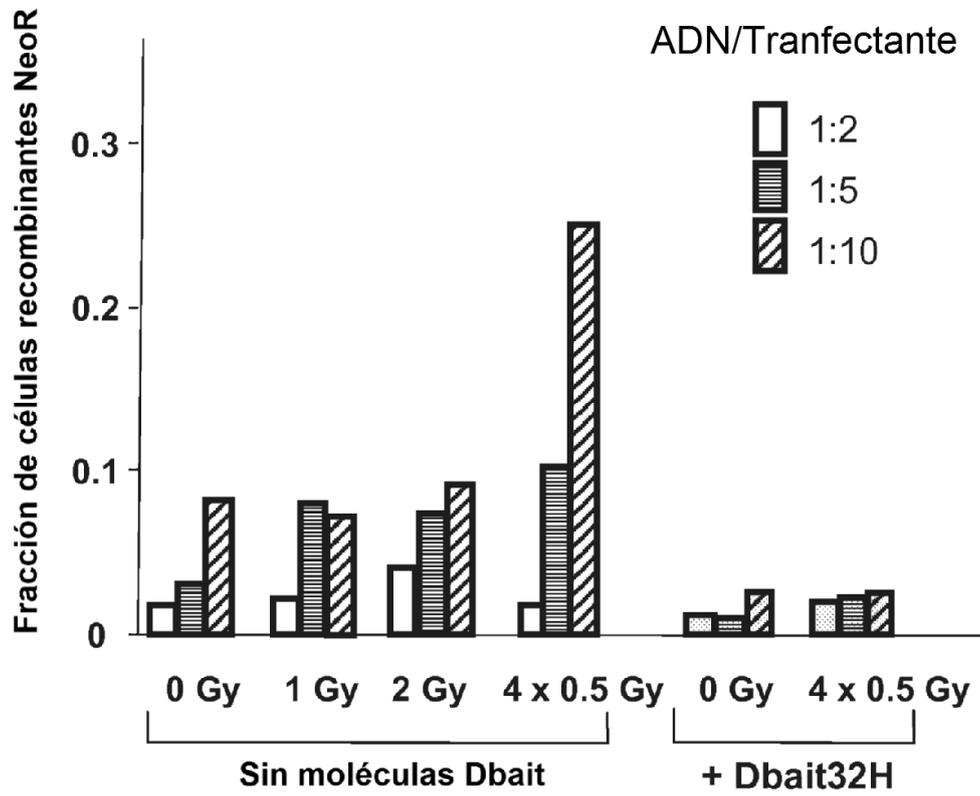


Figura 2.3

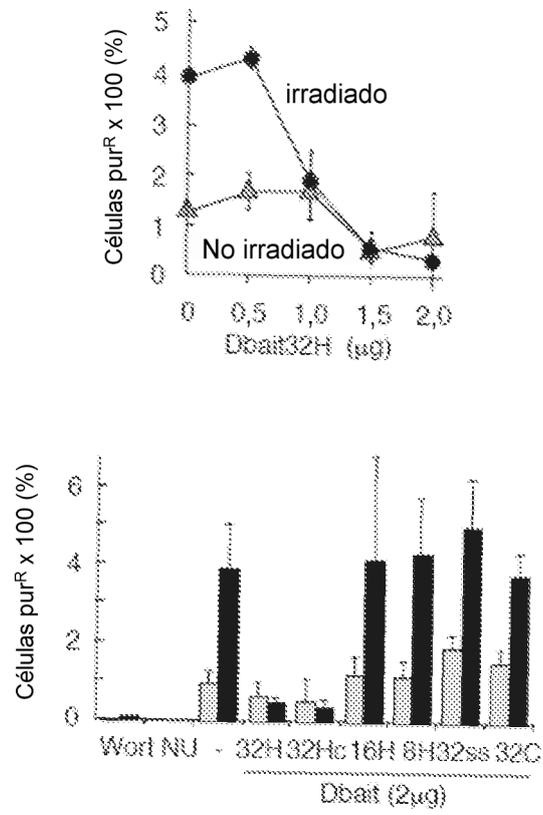


Figura 2.4

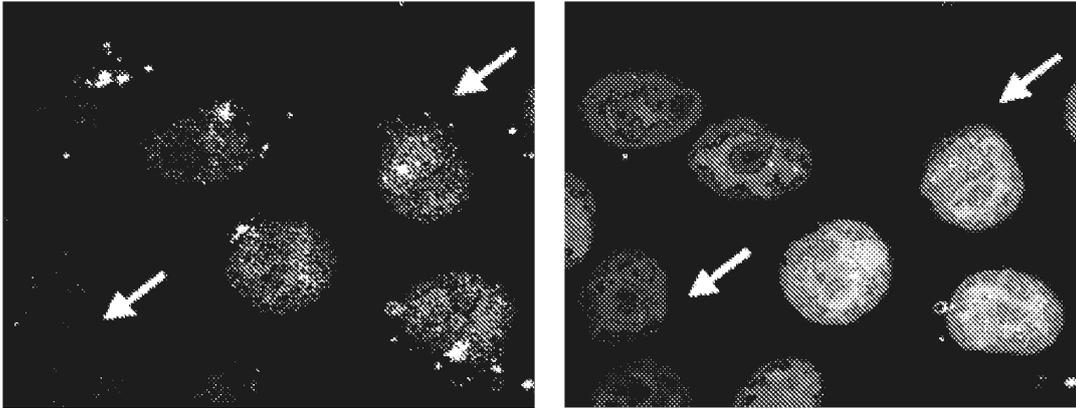


Figura 2.5

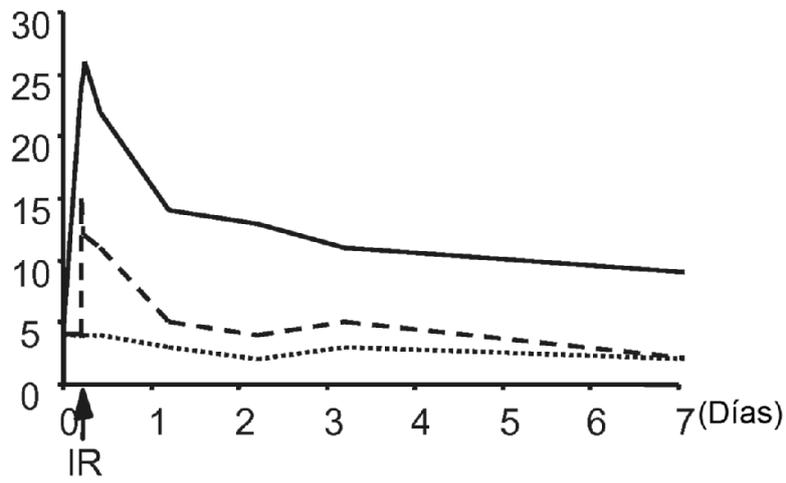
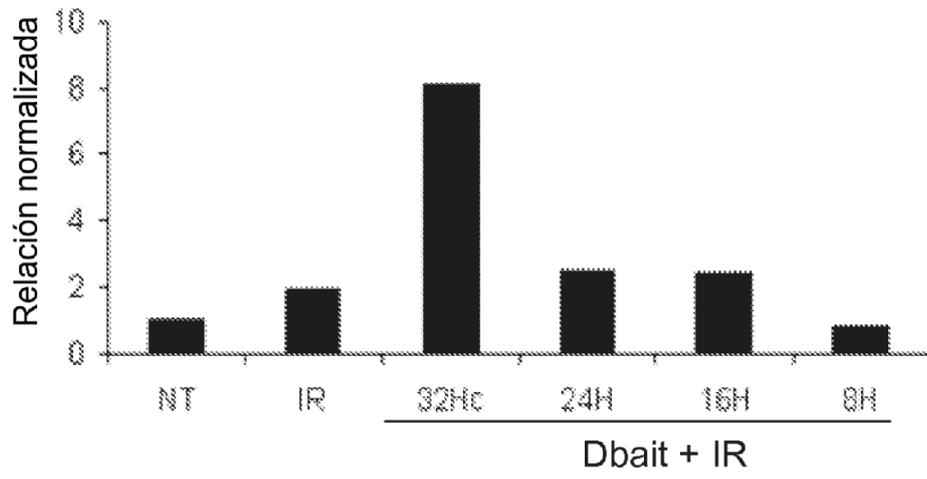


Figura 2.6

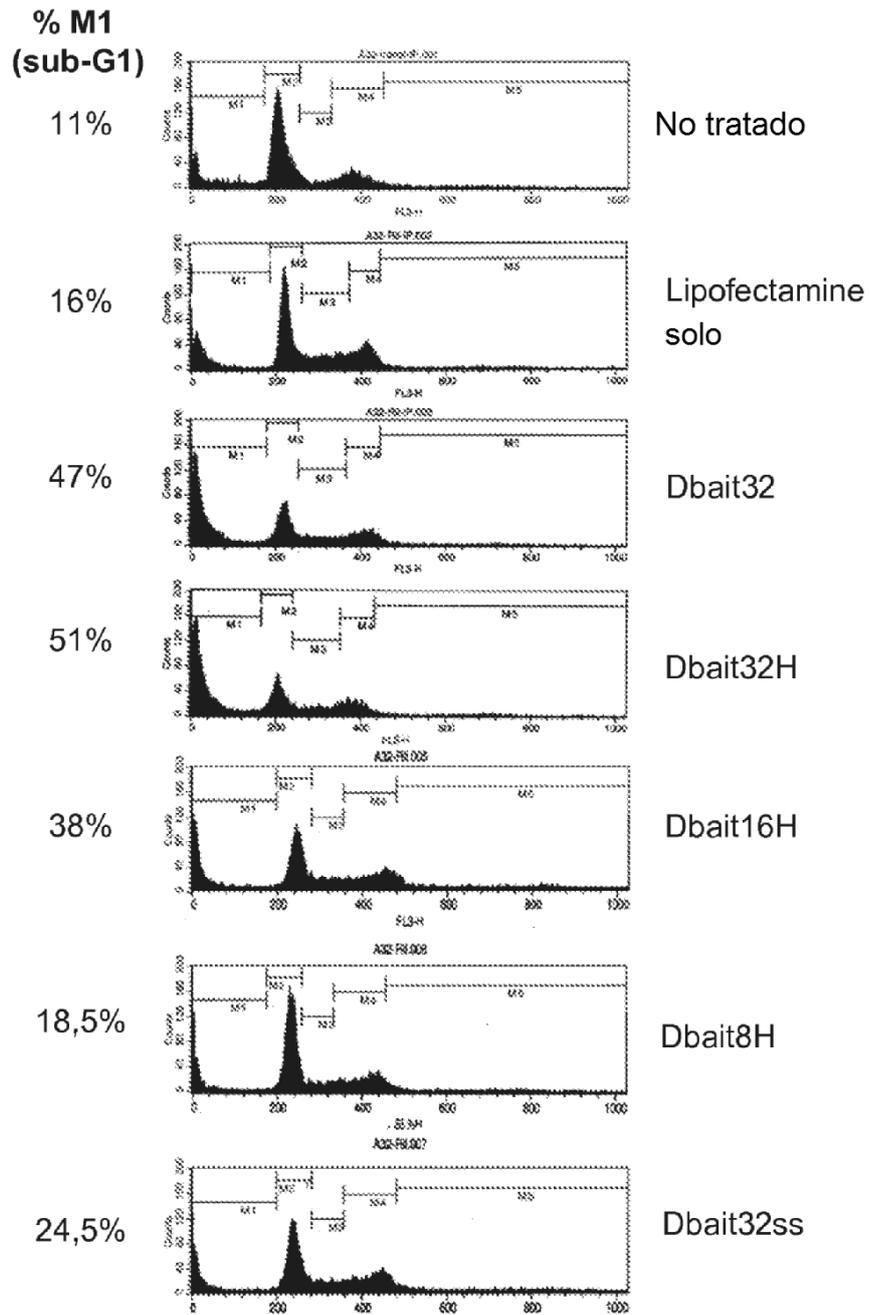


Figura 3.1

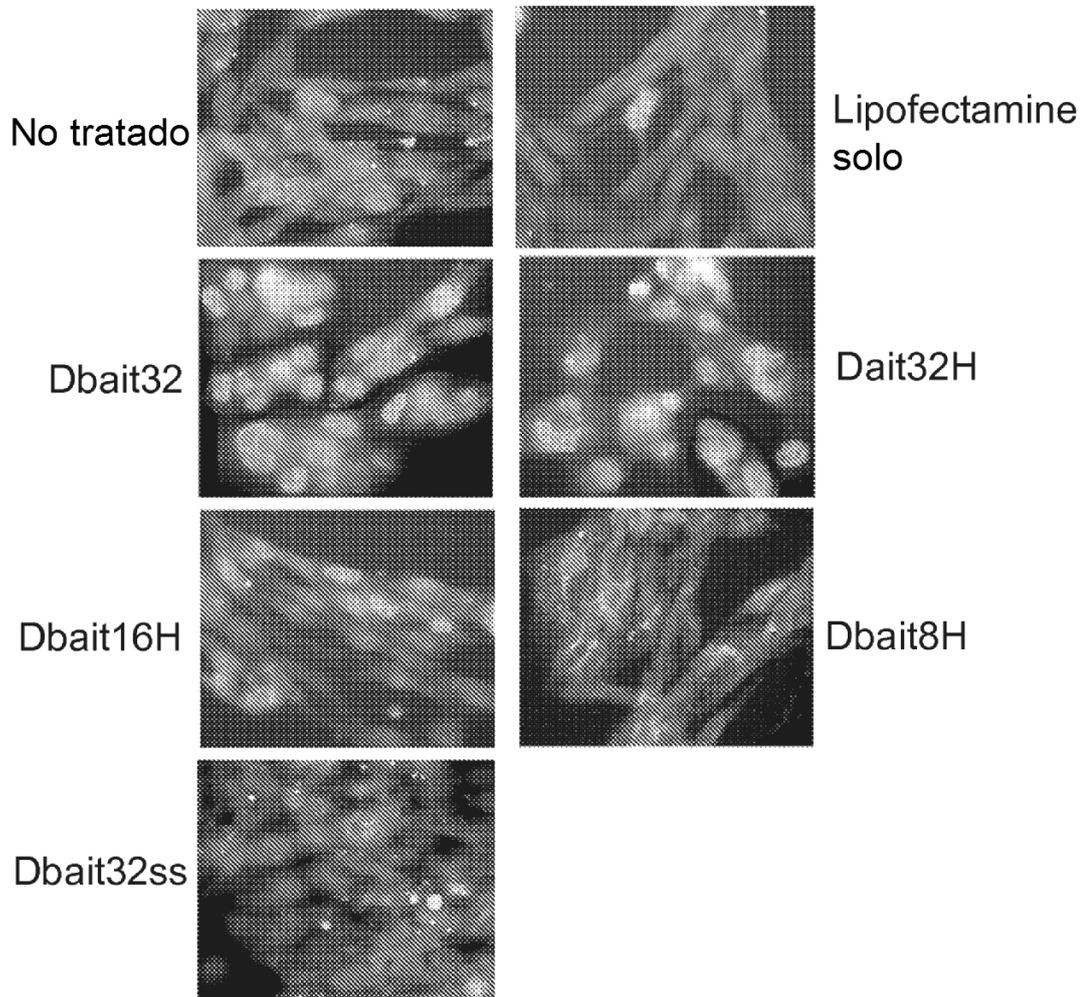


Figura 3.2

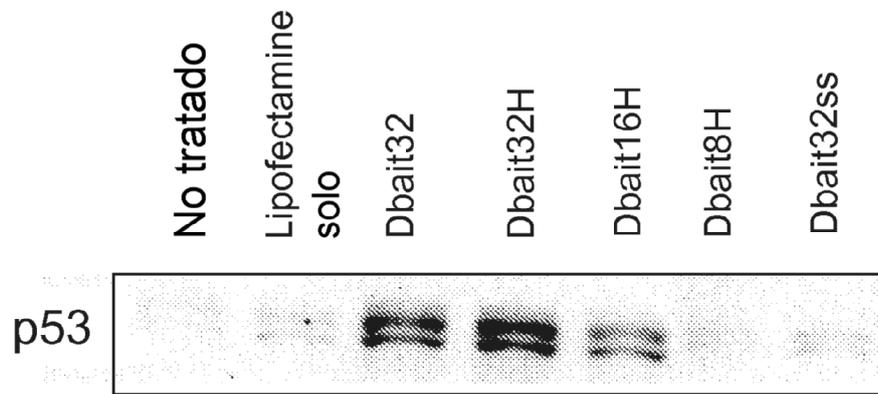


Figura 3.3

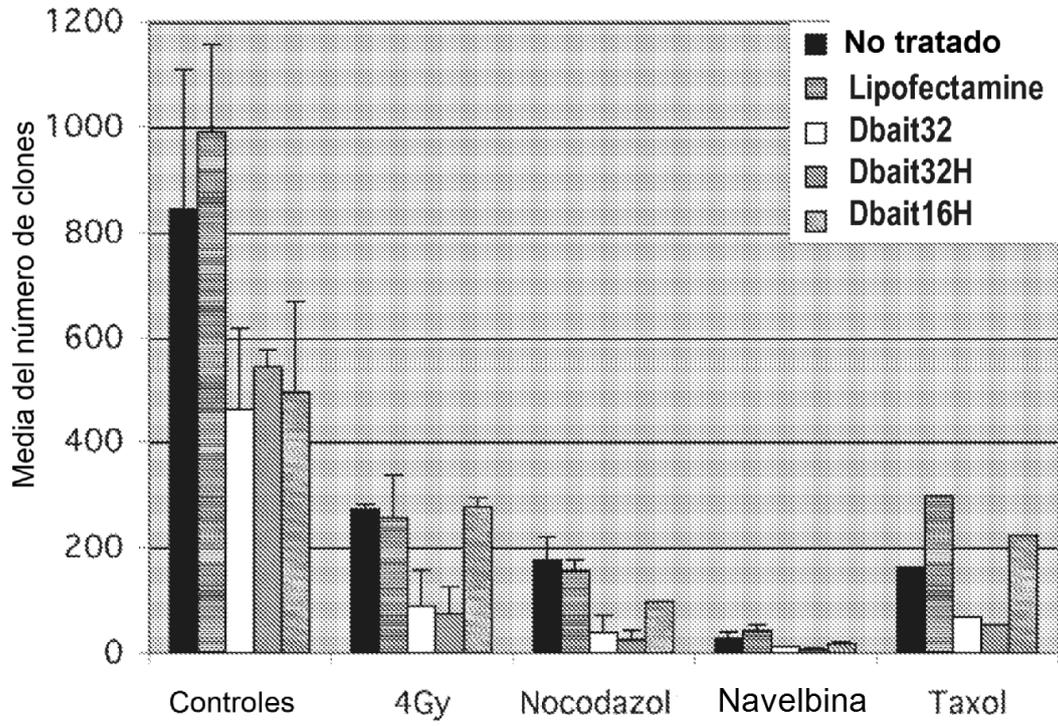


Figura 3.4

Fig 4.1 A

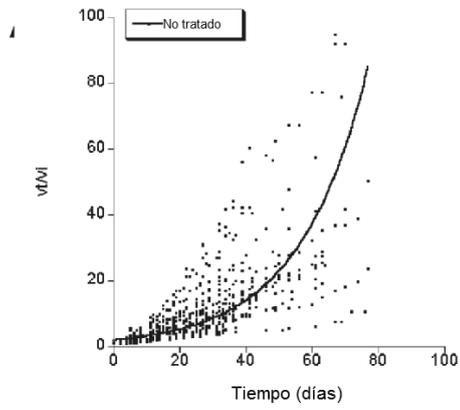


Fig 4.1 B

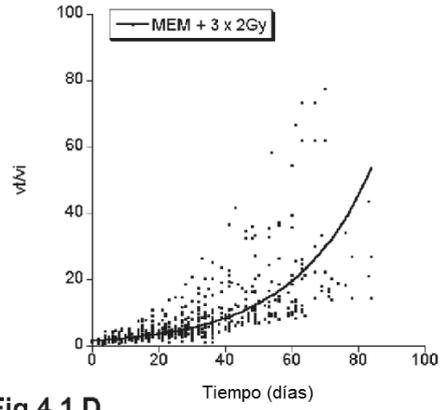


Fig 4.1 C

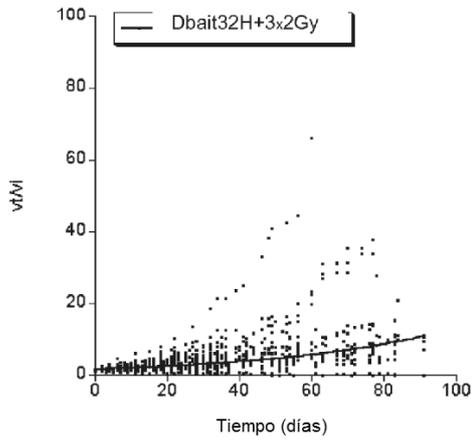


Fig 4.1 D

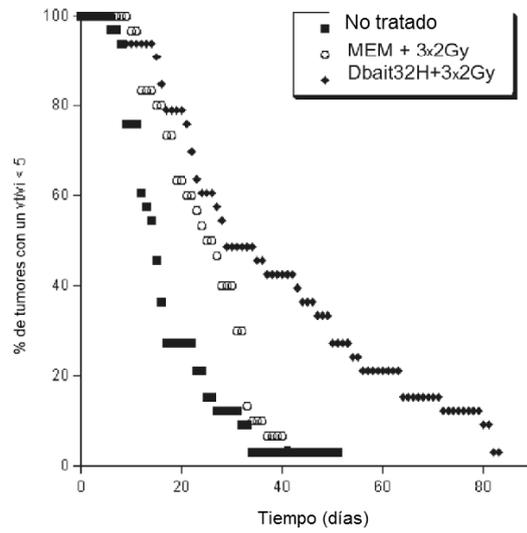


Figura 4.1

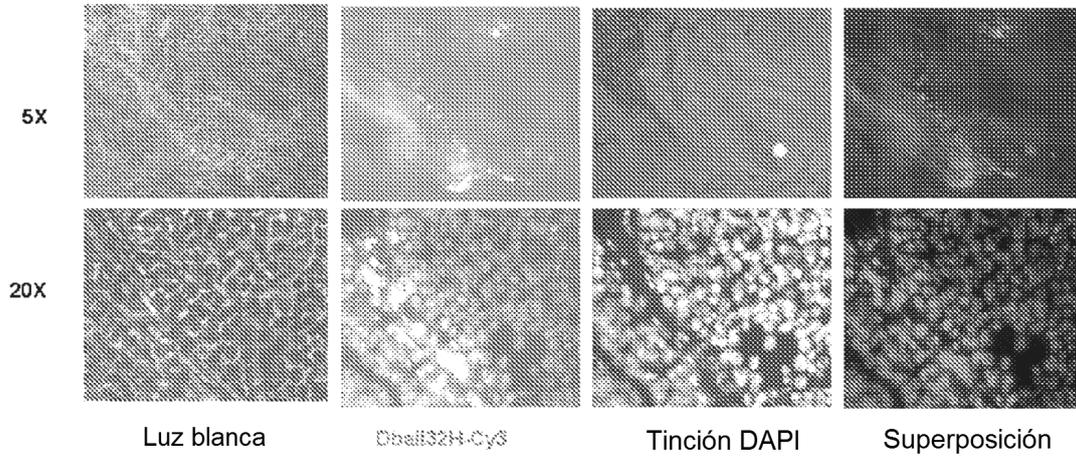


Figura 4.2

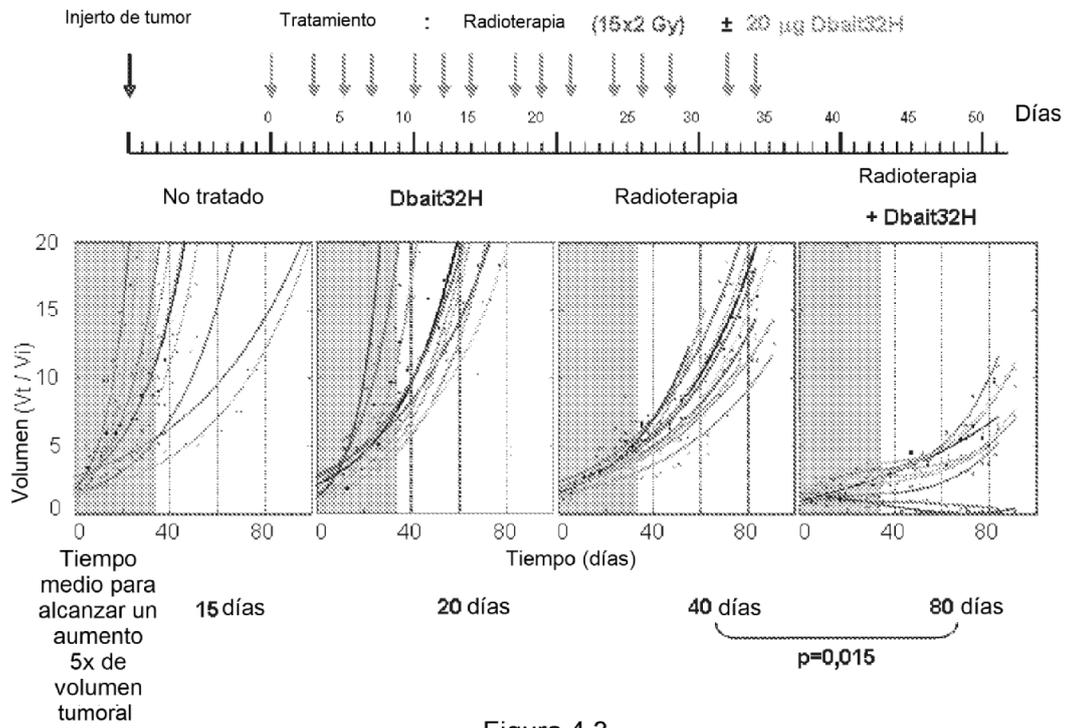


Figura 4.3

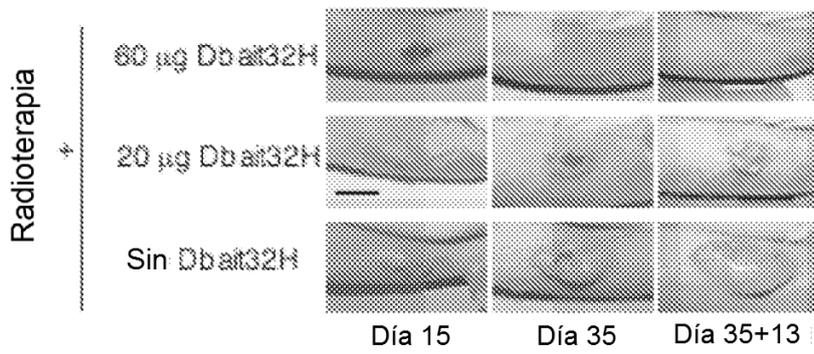
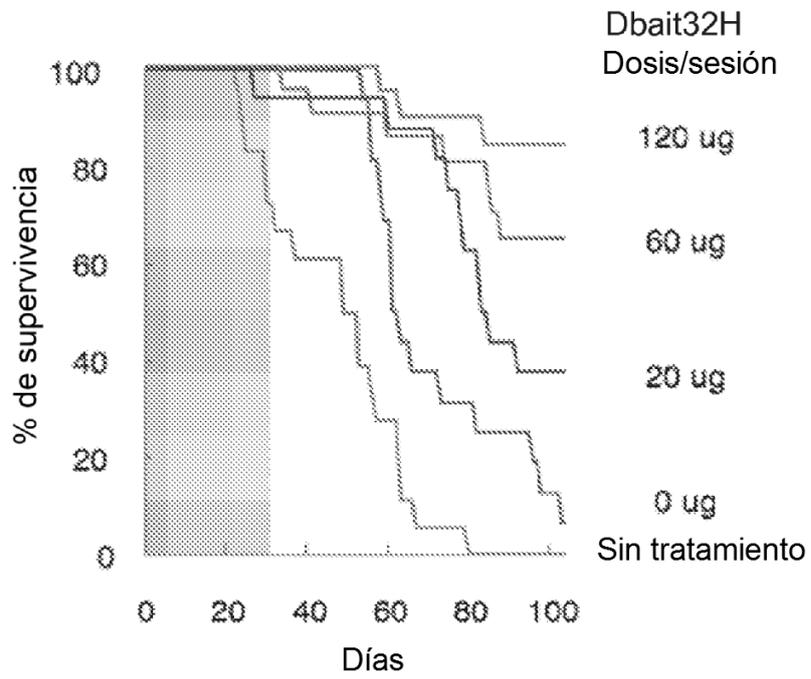


Figura 4.4

Fig 4.5 A

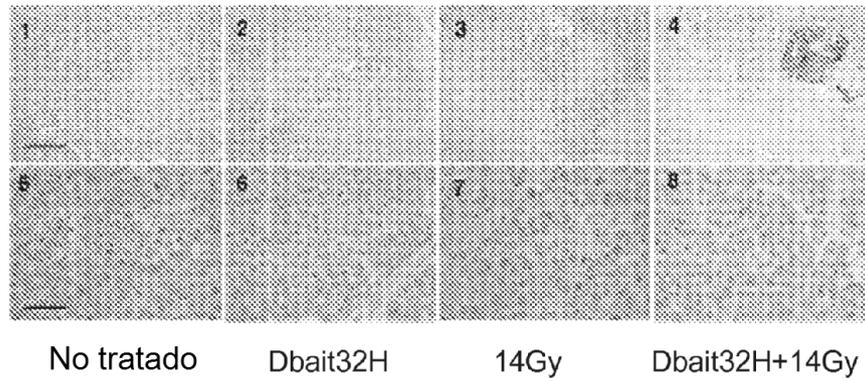
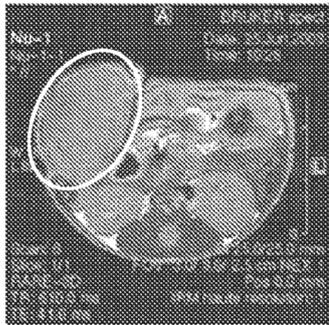


Fig 4.5 B

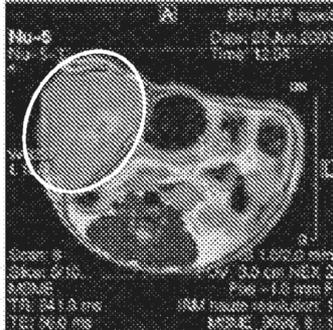
		sin radioterapia	+ radioterapia
Sin Dbait	N.º de mitosis/campo	14	4
	N.º de células apoptóticas/campo	120	200
	% de necrosis	10	50
Dbait32H	N.º de mitosis/campo	16	2
	N.º de células apoptóticas/campo	160	280
	% de necrosis	30	75

Figura 4.5

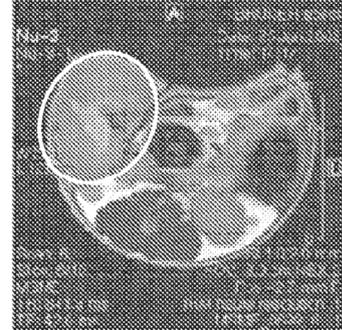
20/24



No tratado



Radioterapia sola



Radioterapia + Dbait32H

Figura 4.6

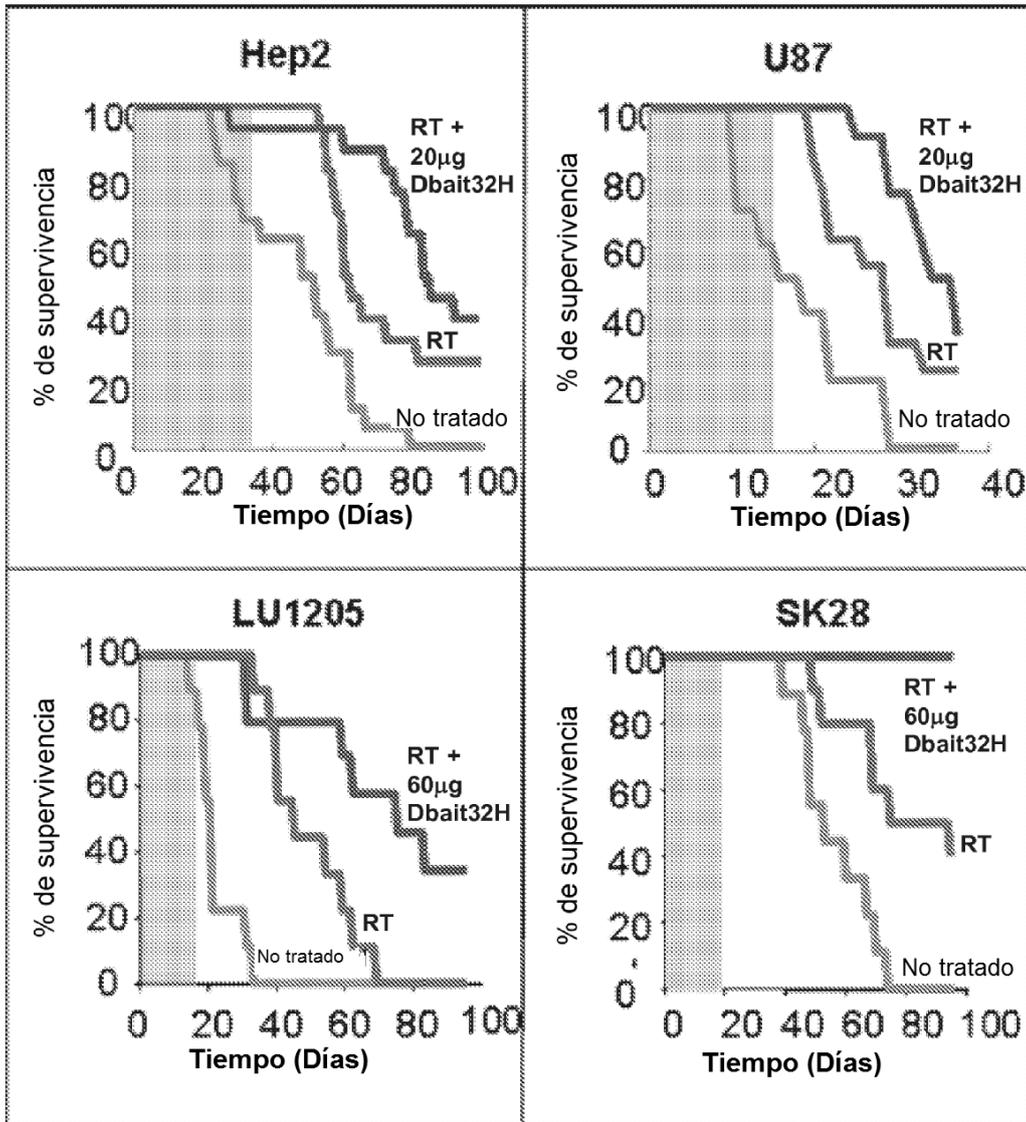


Figura 4.7

Fig 5.1 A

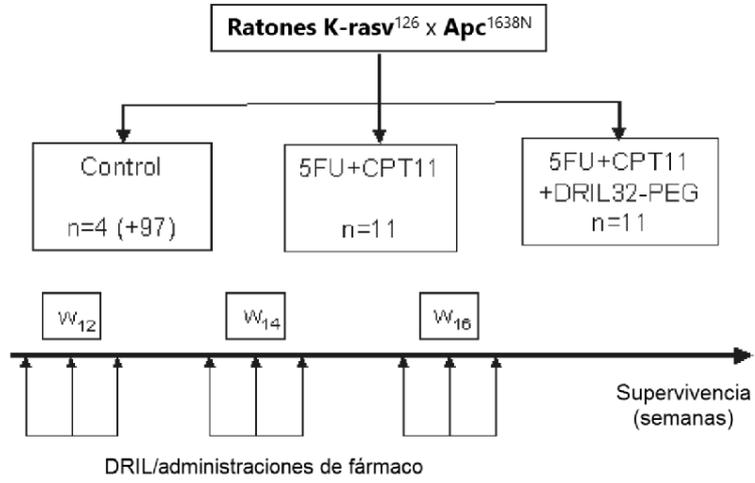


Fig 5.1 B

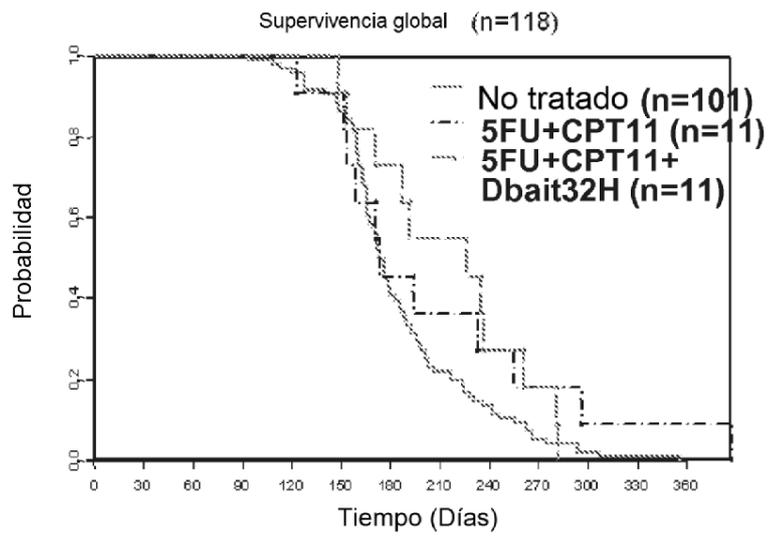


Fig 5.1 C

	Control n=101	5FU+CPT11 n=11	5FU + CPT1+ Dbait32H n=11
Mediana de supervivencia (Días)	176	173	226

Figura 5.1

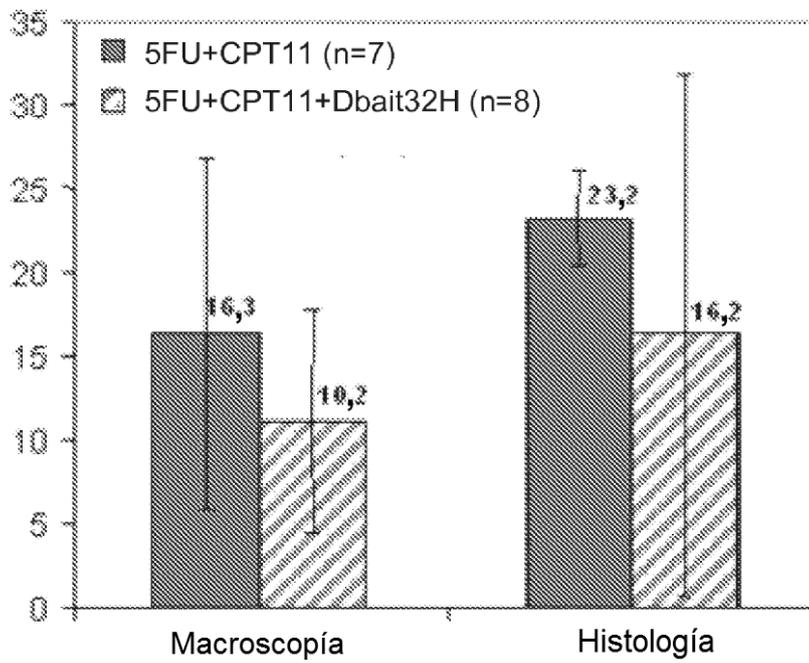
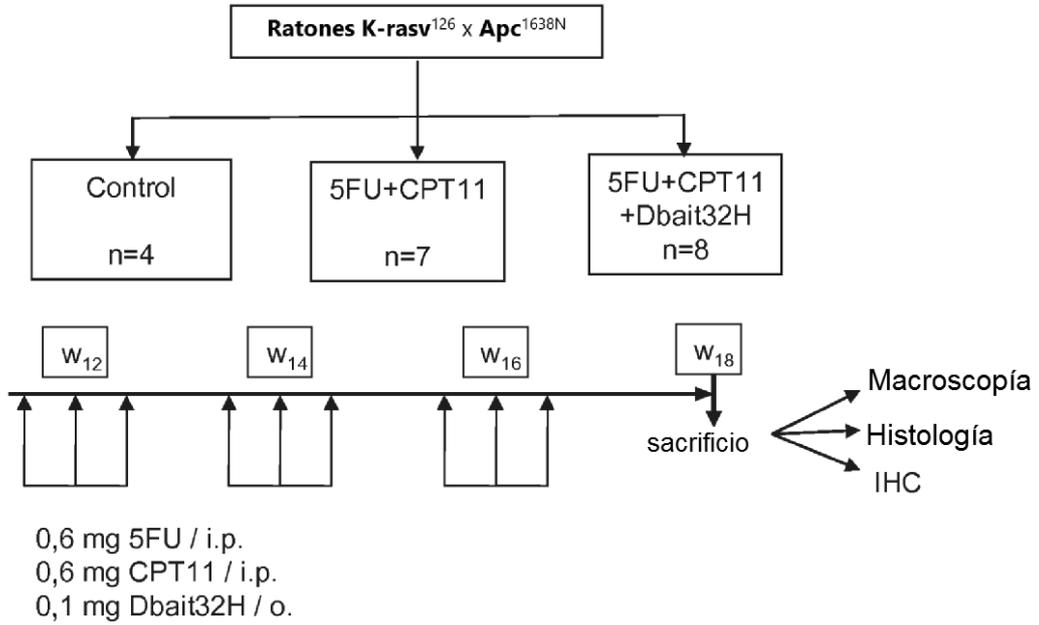
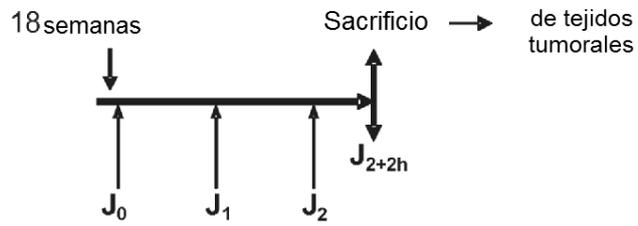


Figura 5.2

Fig 5.3 A

Ratones K-rasv¹²⁶ × Apc^{1638N}



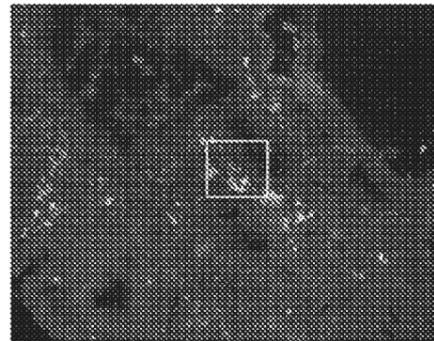
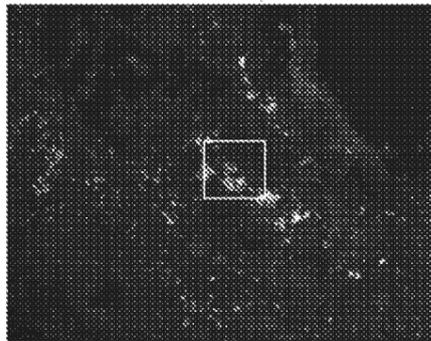
Tratamientos: 0,6 mg 5FU /i.p.
0,6 mg CPT11 /i.p.
0,1 mg Dbait32HFITC / o.

Fig 5.3B

DbaitH-FITC

γ-H2AX

10x



63x

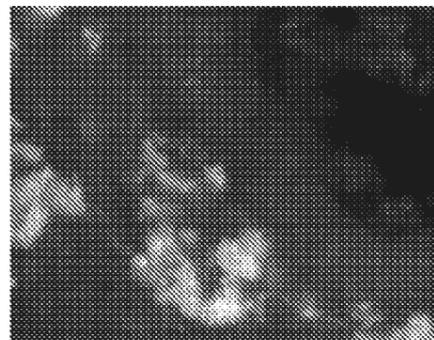
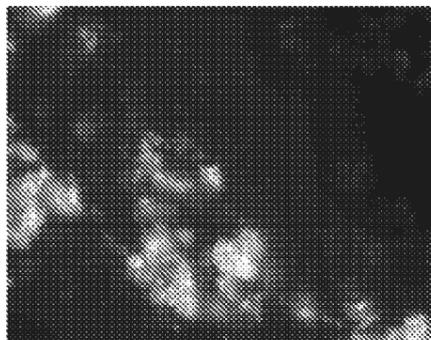


Figura 5.3