

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 435**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/708** (2006.01)

**A61K 31/4725** (2006.01)

**A61K 31/7105** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2013** **E 17199116 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019** **EP 3320906**

54 Título: **Tratamiento de melanoma y carcinoma de pulmón usando un inhibidor de Smad3**

30 Prioridad:

**26.10.2012 US 201261719114 P**

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

**10.07.2019**

73 Titular/es:

**THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG  
(100.0%)  
Shatin, N.T.  
Hong Kong, CN**

72 Inventor/es:

**LAN, HUI YAO**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 719 435 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**

Tratamiento de melanoma y carcinoma de pulmón usando un inhibidor de Smad3

Antecedentes de la invención

- 5 Cáncer es un término genérico para un gran grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo. Una característica definitoria del cáncer es la rápida proliferación de células anormales que crecen más allá de sus límites habituales. Las células cancerosas pueden luego invadir partes adyacentes del cuerpo y diseminarse a otros órganos en un proceso conocido como metástasis. La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer y también puede ser promovida por las células que rodean el cáncer llamadas células estromales cancerosas o microambientes cancerosos.
- 10 Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, causando 7,6 millones de muertes (alrededor del 13% de todas las muertes) en 2008. El cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama causa la mayoría de las muertes por cáncer cada año. A pesar del intenso esfuerzo de investigación y avance tecnológico en las ciencias biomédicas, se prevé que las muertes por cáncer en todo el mundo sigan aumentando, con un estimado de 13,1 millones de muertes en 2030.
- 15 Debido a la prevalencia del cáncer y su impacto significativo en la humanidad, sigue existiendo la necesidad urgente de desarrollar estrategias nuevas y más eficaces para el tratamiento del cáncer. La presente invención aborda esta y otras necesidades relacionadas porque proporciona un nuevo tratamiento anticanceroso usando un inhibidor de Smad3, para inhibir tanto el crecimiento de células cancerosas como la función de soporte del microambiente cancerígeno.
- 20 El documento US 6013788 divulga compuestos antisentido, composiciones y métodos para modular la expresión de Smad3. Las composiciones comprenden compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos antisentido, direccionados a ácidos nucleicos que codifican Smad3. También se divulgan métodos para usar estos compuestos para la modulación de la expresión de Smad3 y para el tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión de Smad3.
- 25 Breve resumen de la invención
- Se discuten a continuación métodos y composiciones útiles para inhibir la proliferación de una célula en base al descubrimiento de que la transducción de señal celular mediada por Smad3 desempeña un papel clave en el desarrollo y la progresión del cáncer, especialmente en los tipos que responden a la estimulación con TGF- $\beta$ , incluidas las células cancerosas y las células estromales cancerosas, tales como las células endoteliales vasculares, fibroblastos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, células T y subconjuntos, células B, macrófagos y células NK.
- 30 De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un inhibidor de Smad3 para uso en el tratamiento de un cáncer seleccionado de melanoma y carcinoma de pulmón.
- A continuación, se describe un método para inhibir la proliferación de una célula, que incluye, pero no se limita a, inhibir la proliferación de células cancerosas, crecimiento de tumores, invasión y la metástasis. El método incluye la etapa de poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un inhibidor de Smad3, que puede ser un inhibidor de molécula pequeña (tal como SIS3 u otro producto químico, ya sea sintético o de origen natural, por ejemplo, un extracto natural de hierbas), o una macromolécula (tal como un anticuerpo inactivador contra Smad3, un polipéptido, un ARNsi, un microARN, un miniARN, un incARN, o un oligonucleótido antisentido). En algunos casos, la célula es una célula cancerosa, que puede estar dentro de un cuerpo humano. En algunos casos, el cáncer es carcinoma de pulmón o melanoma, incluidos los cánceres primarios y metastásicos. También son objetivo del inhibidor de Smad3 diversas células que rodean el tejido canceroso o las células estromales cancerosas, es decir, las células en el microentorno del cáncer primario o metastásico en el cuerpo humano, incluidas las células endoteliales vasculares, fibroblastos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, células T y subconjuntos, células B, macrófagos y células NK dentro del microentorno del cáncer. En algunos casos, la célula diana es una célula cancerosa metastásica dentro del cuerpo humano, tal como una célula en los nodos linfáticos, hígado, pulmón, hueso, riñón, cerebro, tejido gástrico o del colon. En algunos casos, la etapa de contacto puede implicar la administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal u oral. Por ejemplo, el inhibidor de Smad3 se puede administrar en forma de una solución, un polvo, una pasta/crema, un comprimido o una cápsula.
- 45 Una composición útil para inhibir la proliferación celular, por ejemplo, para tratar el cáncer suprimiendo el crecimiento de células cancerosas, y bloqueando las células que soportan el cáncer en el microentorno del cáncer, previniendo así la invasión del cáncer y la metástasis, se analiza a continuación. La composición incluye una cantidad eficaz de un inhibidor de Smad3 y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, la composición está formulada para administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, tópica u oral. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de una solución, un polvo, una pasta/crema, un comprimido o una cápsula.
- 50 A continuación se describe un kit para inhibir la proliferación de una célula, por ejemplo, para tratar el cáncer mediante la supresión del crecimiento de células cancerosas. El kit incluye un recipiente que comprende la
- 55

composición descrita anteriormente. En algunos casos, la composición está formulada para administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, tópica u oral, por ejemplo, la composición puede estar en forma de una solución, un polvo, una pasta/crema, un comprimido o una cápsula. Opcionalmente, el kit comprenderá además un manual de instrucciones para la administración de las primera y segunda composiciones.

5 Los métodos para identificar los inhibidores de Smad3 se discuten a continuación. Uno de tales métodos se basa en la interacción física entre la proteína Smad3 y el inhibidor y, por lo tanto, comprende las etapas: (1) poner en contacto una proteína Smad3 y un compuesto de prueba, bajo condiciones permisibles para la unión entre Smad3 y un inhibidor potencial; y (2) detectar el nivel de unión del compuesto de prueba-Smad3, en donde un mayor nivel de unión por encima del nivel de fondo no específico o un nivel de control negativo indica que el compuesto de prueba es un posible inhibidor de Smad3.

10 Otro método de selección se basa en la detección del efecto inhibitorio directo de un compuesto de prueba en la señalización de Smad3. Se pueden usar ensayos tanto in vitro como in vivo. Por ejemplo, las células que expresan el receptor de Smad3 y TGF- $\beta$  y, por lo tanto, que responden a la estimulación con TGF- $\beta$  pueden ponerse en contacto con un compuesto de prueba, la tasa de proliferación/supervivencia de las células se puede monitorizar y comparar con las células de control que no se han puesto en contacto con el compuesto de prueba. La tasa de crecimiento celular suprimido o el aumento de la muerte celular es una indicación de que un compuesto es un inhibidor de Smad3. Alternativamente, también pueden monitorizarse los cambios corriente abajo debidos a la señalización de TGF- $\beta$ , por ejemplo, el aumento de la fosforilación de la proteína Smad3, la activación de ERK1/2, la expresión de ciclina D1, AKT y mTor para proporcionar una indicación de si un compuesto candidato en particular puede ser un inhibidor de Smad3. Cuando se observa una señalización suprimida a través de Smad3, el compuesto de prueba se identifica como un inhibidor potencial de Smad3.

15 Cuando se usa en cualquiera de los sistemas de ensayo de selección descritos anteriormente, la proteína Smad3 puede producirse de forma de manera recombinante o expresarse de manera endógena en una célula, y los ensayos pueden realizarse en un entorno basado en células completas o sin células. Un compuesto que se haya identificado como un inhibidor de Smad3 puede someterse a pruebas adicionales para confirmar su efecto inhibitorio.

#### Breve descripción de los dibujos

Fig. 1. Los ratones que carecen de Smad3 están protegidos contra el crecimiento de carcinoma de pulmón (LLC) desde el día 14 en adelante. Obsérvese que, a diferencia de los ratones de tipo silvestre con Smad3, no se detectan cánceres en ratones con desactivación de Smad3 mediante imagenología in vivo (A, B), volumen tumoral cuantitativo (C) y peso tumoral (D) durante los días 14-21 después de la implantación subcutánea de células cancerígenas LLC (3 millones de células/ratón), lo que indica microambientes dependientes de Smad3 que determinan el crecimiento del cáncer. N = 6.

Fig. 2. Los ratones que carecen de Smad3 están protegidos del crecimiento, invasión, metástasis y muerte por melanoma (B16F10). Obsérvese que, a diferencia de los ratones de tipo silvestre con Smad3, los ratones con desactivación de Smad3 están protegidos contra el crecimiento (A-C), invasión (no mostrada), metástasis y muerte (C) de células B16F10 subcutáneas. Esto se confirma adicionalmente mediante inyección intravenosa de células B16F10 (3 millones de células/ratón), lo que demuestra que los ratones con desactivación de Smad3 evitan en gran medida la formación de tumores metastásicos en los pulmones (E y F). Los resultados de este estudio demuestran que los microambientes dependientes de Smad3 promueven el crecimiento, invasión, metástasis y muerte por cáncer. N = 6.

Fig. 3. El análisis de imagenología in vivo muestra que el inhibidor de Smad3 (SIS3) inhibe el crecimiento del melanoma (B16F10) en una forma dependiente de la dosis en un modelo de ratón singénico. N = 5

Fig. 4. El inhibidor de Smad3 (SIS3) inhibe el crecimiento del cáncer como se demuestra reduciendo notablemente el peso del cáncer en el melanoma subcutáneo (B16F10, 3 millones de células/ratón) de una manera dependiente de la dosis en un modelo de ratón singénico. N = 5

Fig. 5. El inhibidor de Smad3 (SIS3) inhibe el crecimiento del cáncer (A) y previene la invasión y metástasis, y muerte (B) por cáncer inducida por melanoma subcutáneo (B16F10, 3 millones de células/ratón) en una forma dependiente de la dosis en un modelo de ratón singénico. Obsérvese que la invasión por cáncer en los tejidos subcutáneos o los músculos del cuerpo (\*) y la metástasis a los ganglios linfáticos (LN), pulmón y colon se mitigan mediante el tratamiento con SIS3. N = 5.

Fig. 6. SIS3 previene el crecimiento de carcinoma de pulmón LLC. (A) Análisis de imágenes in vivo, (B) análisis cuantitativo del volumen del tumor. Los resultados muestran que el inhibidor de Smad3 (SIS3) inhibe el crecimiento del carcinoma de pulmón (LLC) en una forma dependiente de la dosis en un modelo de ratón singénico. Tenga en cuenta que la mayoría de los cánceres se vuelven indetectables después de 10 días de tratamiento con SIS3 en dosis de 5-10  $\mu$ g/g de peso corporal. N = 5

Fig. 7. El inhibidor de Smad3 (SIS3) previene el crecimiento del cáncer según lo demuestra el peso tumoral (A) y la

muerte (B) inducida por carcinoma de pulmón subcutáneo (LLC, 2 millones de células/ratón) en una forma dependiente de la dosis en un modelo de ratón singénico. N = 5

#### Definiciones

5 El término "que inhibe" o "inhibición", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier efecto negativo detectable en un proceso biológico objetivo, tal como la transducción de señal celular, la proliferación celular, la tumorigenicidad y el potencial metastásico. Típicamente, una inhibición se refleja en una disminución de al menos 10%, 20%, 30%, 40% o 50% en el proceso objetivo (por ejemplo, señalización mediada por Smad3 o proliferación de cáncer) o cualquiera de los parámetros posteriores mencionados arriba, cuando se compara con un control.

10 El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y sus polímeros en forma monocatenaria o bicatenaria. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos naturales. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente variantes de la misma modificadas conservativamente (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, 15 ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con residuos de base mixta y/o de desoxinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260: 2605 - 2608 (1985) y Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8: 91 - 98 (1994)). El término ácido nucleico se usa de manera intercambiable con el gen, ADNc y 20 ARNm codificado por un gen.

El término "gen" significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica. Puede incluir regiones que preceden y siguen a la región de codificación (líder y cola) así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos de codificación individuales (exones).

25 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos que se producen naturalmente son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono  $\alpha$  que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, 30 homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas peptídicas principales modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. "Miméticos de aminoácidos" se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido de origen natural.

35 Existen diversos métodos conocidos en la técnica que permiten la incorporación de un derivado o análogo de aminoácido no natural en una cadena polipeptídica de una manera específica del sitio, véase, por ejemplo, el documento WO 02/086075.

40 Se pueden hacer referencia en la presente memoria a los aminoácidos mediante los símbolos de tres letras comúnmente conocidos o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Los nucleótidos, del mismo modo, pueden ser mencionados por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

45 "Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los tres términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales y polímeros de aminoácidos no naturales. Como se usa en este documento, los términos abarcan cadenas de aminoácidos de cualquier longitud, incluyendo proteínas de longitud completa, en donde los residuos de aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos covalentes.

50 El término "cantidad efectiva", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que produce efectos terapéuticos para los que se administra una sustancia. Los efectos incluyen la prevención, corrección o inhibición de la progresión de los síntomas de una enfermedad/condición y complicaciones relacionadas en cualquier extensión detectable. La cantidad exacta dependerá de la naturaleza del agente terapéutico, la forma de administración, y el propósito del tratamiento, y puede ser averiguado por un experto en la técnica usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992), Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999) y Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

55 Un "casete de expresión" es una construcción de ácido nucleico, generada de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de una secuencia de polinucleótido particular en una célula huésped. Un casete de expresión puede ser parte de un plásmido, genoma viral o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, un casete de expresión incluye un polinucleótido a transcribir,

unido operativamente a un promotor.

Un "anticuerpo" se refiere a un polipéptido sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, que se unen específicamente y reconocen un antígeno, por ejemplo, la proteína Smad3. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

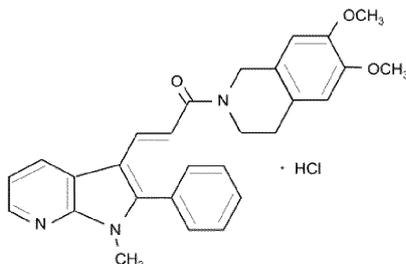
Un ejemplo de unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo terminal N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable ( $V_L$ ) y cadena pesada variable ( $V_H$ ) se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.

Los anticuerpos pueden existir en diversas formas, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir  $F(ab)'_2$ , un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a  $V_H-C_H1$  por un enlace disulfuro. El  $F(ab)'_2$  puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo así el dímero  $F(ab)'_2$  en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, Paul (Ed.) Fundamental Immunology, Tercera Edición, Raven Press, NY (1993)). Aunque varios fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos pueden sintetizarse nuevamente ya sea químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante.

La modificación adicional de anticuerpos mediante tecnologías recombinantes también es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos quiméricos combinan las regiones de unión a antígeno (regiones variables) de un anticuerpo de un animal con las regiones constantes de un anticuerpo de otro animal. Generalmente, las regiones de unión a antígeno se derivan de un animal no humano, mientras que las regiones constantes se extraen de anticuerpos humanos. La presencia de las regiones constantes humanas reduce la probabilidad de que el anticuerpo sea rechazado como extraño por un receptor humano. Por otro lado, los anticuerpos "humanizados" combinan una porción aún más pequeña del anticuerpo no humano con componentes humanos. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende las regiones hipervariables, o las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), de un anticuerpo no humano injertado en las regiones marco apropiadas de un anticuerpo humano. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificados para parecerse más a la inmunoglobulina humana. Tanto los anticuerpos quiméricos como humanizados se preparan usando técnicas recombinantes, que son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Jones et al. (1986) Nature 321: 522 - 525).

Por lo tanto, el término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos por la modificación de anticuerpos completos o anticuerpos sintetizados nuevamente utilizando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena simple, un anticuerpo quimérico o humanizado).

El término "SIS3", como se usa en el presente documento, se refiere a un inhibidor selectivo permeable de una célula de fosforilación de Smad3 dependiente de TGF- $\beta$ 1 y señalización celular mediada por Smad3. Es un compuesto químico que tiene un peso molecular de 453,5, nombre químico (6,7-Dimetoxi-2-((2E)-3-(1-metil-2-fenil-1H-pirrol[2,3-b] piridin-3-il-prop-2-enil))-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina), y la estructura química que se muestra a continuación:



SIS3 puede sintetizarse a partir de derivados de indol de acuerdo con métodos publicados de ácido 2-(N-metilindolil) acrílico, seguido por condensación con la amina correspondiente. Véase, por ejemplo, Jinnin et al. 2006 Mol. Pharmacol. 69: 597. SIS3 también está disponible comercialmente a través de varios proveedores, tales como Santa Cruz, Sigma y Millipore, solo para fines de investigación biológica básica.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

El cáncer sigue siendo una de las principales causas de muertes humanas. El tratamiento del cáncer con fármacos citotóxicos es, con frecuencia, ineficaz y presenta una alta citotoxicidad con efectos secundarios sistémicos graves. La creciente evidencia muestra que el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) actúa como un potente promotor tumoral en el carcinoma establecido. El TGF- $\beta$  derivado del cáncer impulsa la progresión maligna al inducir constitutivamente la transición epitelial a mesenquimal y la angiogénesis asociada a tumores, y mediante la supresión de la inmunidad antitumoral en el microambiente del cáncer. Con base en esa información, se han desarrollado muchos enfoques terapéuticos dirigidos a los receptores de TGF- $\beta$  utilizando el receptor II soluble de TGF- $\beta$ , inhibidores de la quinasa ALK5 de molécula pequeña, así como anticuerpos neutralizantes, por parte de investigadores y compañías farmacéuticas. Algunos de ellos se han mostrado prometedores en los primeros estudios preclínicos, incluidos SD-093, SD-208 y SM16. Sin embargo, TGF- $\beta$  es una citoquina antiinflamatoria fundamental y el bloqueo general de TGF- $\beta$  a nivel del receptor de TGF- $\beta$  también es problemático debido a la probabilidad de causar enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, la investigación aplicada de la señalización de TGF- $\beta$  para identificar objetivos terapéuticos más específicos relacionados con la progresión del cáncer puede ofrecer una mejor terapia contra el cáncer clínicamente.

Un nuevo descubrimiento de un estudio reciente realizado por el grupo del inventor fue que los ratones nulos para Smad3, un mediador clave de la señalización del TGF- $\beta$ , están protegidos contra el crecimiento del cáncer, invasión, metástasis (por ejemplo, a los tejidos de ganglios linfáticos, hígado, pulmón, gástrico y de colon) y muerte en dos modelos de cáncer altamente invasivos, que incluyen el carcinoma de pulmón (LLC) y melanoma (B16F10). Este hallazgo indica que el microambiente del cáncer dependiente de Smad3 en el huésped determina la progresión o regresión del cáncer. Esto también indica que dirigirse a Smad3 en el microambiente del cáncer (y también al cáncer) puede ofrecer una mejor terapia contra el cáncer. Se realizó un estudio para probar esta nueva estrategia terapéutica mediante direccionamiento a Smad3 con un inhibidor de Smad3 (SIS3) en melanoma establecido (B16F10) en ratones. De forma similar a los resultados observados en ratones con desactivación de Smad3, el tratamiento con SIS3 virtualmente suprimió el crecimiento, la invasión y la metástasis del cáncer y evitó la muerte por cáncer. Por lo tanto, SIS3 es un nuevo medicamento contra el cáncer que se dirige a TGF- $\beta$ /Smad3, que es altamente relevante desde el punto de vista clínico y puede dar como resultado una terapia anticancerosa nueva, más segura y más efectiva.

II. Tecnología recombinante general

Los textos básicos que describen métodos y técnicas generales en el campo de la genética recombinante incluyen Sambrook y Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3ª edición, 2001); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology* (1994).

Para ácidos nucleicos, los tamaños se dan en kilobases (kb) o pares de bases (pb). Estas son estimaciones derivadas de la electroforesis en gel de agarosa o acrilamida, de ácidos nucleicos secuenciados o de secuencias de ADN publicadas. Para las proteínas, los tamaños se dan en kilodaltons (kDa) o número de residuos de aminoácidos. El tamaño de las proteínas se estima a partir de electroforesis en gel, de proteínas secuenciadas, de secuencias derivadas de aminoácidos o de secuencias de proteínas publicadas.

Los oligonucleótidos que no están disponibles comercialmente se pueden sintetizar químicamente, por ejemplo, de acuerdo con el método de triéster de fosoramidita en fase sólida descrito por primera vez por Beaucage & Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22: 1859 - 1862 (1981), usando un sintetizador automático, como se describe en Van Devanter et. al., *Nucleic Acids Res.* 12: 6159 - 6168 (1984). La purificación de oligonucleótidos se realiza usando cualquier estrategia reconocida en la técnica, por ejemplo, electroforesis en gel de acrilamida nativa o HPLC de intercambio aniónico como se describe en Pearson & Reanier, *J. Chrom.* 255: 137 - 149 (1983).

La secuencia de un gen de interés, un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés, y oligonucleótidos sintéticos puede verificarse después de la clonación o subclonación usando, por ejemplo, el método de terminación de cadena para secuenciar plantillas bicatenarias de Wallace et al., *Gene* 16: 21 - 26 (1981).

III. Identificación de inhibidores para la señalización mediada por Smad3

Los inhibidores de la actividad de Smad3 pueden ser de virtualmente cualquier naturaleza química y estructural: pueden ser polipéptidos, polinucleótidos y moléculas pequeñas. Siempre que posean un efecto inhibitorio confirmado contra Smad3 como mediador de transducción de señales corriente abajo de TGF- $\beta$ , tales inhibidores pueden ser útiles para inhibir la proliferación de células cancerosas y, por lo tanto, útiles para tratar el cáncer.

A. Ensayos de unión de Smad3

Se puede usar un ensayo in vitro para detectar posibles inhibidores de la señalización de Smad3 basados en la unión entre Smad3 y un compuesto candidato. Una vez que se identifica un compuesto en el ensayo de unión, se pueden realizar pruebas adicionales para confirmar y verificar la capacidad de los compuestos para inhibir la señalización mediada por Smad3. En general, tal ensayo se puede realizar en presencia de una proteína Smad3 o un fragmento de la misma, por ejemplo, una proteína o fragmento Smad3 producido de forma recombinante, bajo

condiciones que permitan su unión a una posible pareja de unión. Por conveniencia, la proteína Smad3 o el compuesto candidato pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido y/o marcarse con una fracción detectable. También se puede utilizar una tercera molécula, tal como un anticuerpo (que puede incluir un marcador detectable) para la proteína Smad3, para facilitar la detección.

- 5 En algunos casos, los ensayos de unión pueden realizarse en un entorno libre de células; mientras que en otros casos, los ensayos de unión pueden realizarse dentro de una célula o en la superficie celular, por ejemplo, usando células que expresan de forma recombinante o endógena un polipéptido Smad3 apropiado.

#### B. Ensayos de fosforilación de Smad3

10 Los inhibidores de la señalización celular mediada por Smad3 son útiles por su capacidad para inhibir la señalización de TGF- $\beta$ , especialmente como agentes terapéuticos anticancerosos para pacientes que padecen cáncer exacerbado por la señalización de TGF- $\beta$ . Los ensayos para confirmar tal efecto inhibitorio de un inhibidor pueden realizarse in vitro o in vivo. Un ensayo in vitro típicamente involucra la exposición de células cultivadas a un inhibidor y la monitorización de cambios biológicos y bioquímicos subsiguientes en las células. Por ejemplo, después de la exposición a un inhibidor a 0.1-20  $\mu\text{g/ml}$  durante 0.5-48 horas, las células adecuadas (tal como las que expresan Smad3, receptor de TGF- $\beta$  y sensibles a la estimulación con TGF- $\beta$ ) se examinan para determinar su estado de proliferación/supervivencia utilizando métodos tales como el recuento directo de células, BrdU o la incorporación de H<sup>3</sup>-timidina, ensayo de proliferación celular de sal de tetrazolio 3,[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT), ensayo de proliferación celular de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio (MTS), ensayo de membrana alantoica de embrión de pollo (CAM), ensayo de TUNNEL, ensayo de unión a anexina V, etc. También pueden monitorizarse cambios corriente abajo adicionales debido a la señalización de TGF- $\beta$ , por ejemplo, la fosforilación de la proteína Smad3, la activación de ERK1/2, la expresión de ciclina D1 y la activación de AKT para proporcionar una indicación de la señalización suprimida a través de Smad3. Además, la tumorigenicidad y/o el potencial metastásico de las células cancerosas también son parámetros útiles para la monitorización y pueden probarse mediante métodos tales como análisis de formación de colonias o ensayos de agar blando. Se detecta un efecto inhibitorio cuando se observa una disminución en la señalización mediada por Smad3, como lo indica cualquiera de los parámetros mencionados anteriormente, de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más.

15 Los efectos anticancerígenos de un inhibidor de señalización de Smad3 de la presente invención también se pueden demostrar en ensayos in vivo. Por ejemplo, un inhibidor de Smad3 se puede inyectar en animales que tienen un sistema inmunitario comprometido (por ejemplo, ratones lampiños, ratones SCID o ratones NOD/SCID) y, por lo tanto, permiten tumores de xenoinjerto. Los métodos de inyección pueden ser de naturaleza subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal o intratumoral. El desarrollo de tumores se controla posteriormente por diversos medios, tales como la medición del volumen del tumor y la calificación de lesiones secundarias debidas a metástasis, en comparación con un grupo de control de animales con tumores similares pero que no reciben el inhibidor. La sección de Ejemplos de esta divulgación proporciona una descripción detallada de algunos ensayos de ejemplo in vivo. Se detecta un efecto inhibitorio cuando se establece un efecto negativo sobre el crecimiento del tumor o la metástasis en el grupo de prueba. Preferiblemente, el efecto negativo es al menos una disminución del 10%; más preferiblemente, la disminución es de al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%.

20 Como se indicó anteriormente, los inhibidores de Smad3 pueden tener diversas características químicas y estructurales. Por ejemplo, un inhibidor puede ser un mutante no funcional de Smad3 que retiene la capacidad de unión de Smad3 a sus moléculas de señalización corriente arriba o corriente abajo, un anticuerpo contra Smad3 que interfiere con la señalización mediada por Smad3, o cualquier molécula pequeña o macromolécula que simplemente dificulta la interacción entre Smad3 y sus moléculas de señalización corriente arriba o corriente abajo. Esencialmente, cualquier compuesto químico se puede probar como un inhibidor potencial de la señalización de Smad3. Los más preferidos son generalmente compuestos que pueden disolverse en soluciones acuosas u orgánicas (especialmente basadas en DMSO). Los inhibidores pueden identificarse seleccionando una biblioteca combinatoria que contiene un gran número de compuestos potencialmente efectivos. Tales bibliotecas químicas combinatorias pueden seleccionarse en uno o más ensayos, como se describe en este documento, para identificar aquellos miembros de la biblioteca (especies químicas particulares o subclases) que muestran una actividad característica deseada. Los compuestos identificados de este modo pueden servir como "compuestos guía" convencionales o pueden usarse ellos mismos como agentes terapéuticos potenciales o reales.

25 La preparación y selección de bibliotecas químicas combinatorias es bien conocida por los expertos en la técnica. Tales bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de péptidos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.010.175, Furka, Int. J. Pept. Prot. Res. 37: 487-493 (1991) y Houghton et al., Nature 354: 84-88 (1991)) y bibliotecas de hidratos de carbono (véanse, por ejemplo, Liang et al., Science, 274: 1520-1522 (1996) y la patente de EE. UU. 5.593.853). También se pueden usar otros químicos para generar bibliotecas de diversidad química. Tales sustancias químicas incluyen, pero no se limitan a: peptoides (Publicación PCT No. WO 91/19735), péptidos codificados (Publicación PCT WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (Publicación PCT No. WO 92/00091), benzodiazepinas (Patente de Estados Unidos N° 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílicos (Hagihara et al., J. Amer. Chem. Soc. 114: 6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con andamiajes de  $\beta$ -D-

glucosa (Hirschmann et al., J. Amer. Chem. Soc. 114: 9217-9218 (1992)), síntesis de análogos orgánicos de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen et al., J. Amer. Chem. Soc. 116: 2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho et al., Science 261: 1303 (1993)) y/o peptidilfosfonatos (Campbell et al., J. Org. Chem. 59: 658 (1994)), bibliotecas de ácidos nucleicos (véase, Ausubel, Berger and Sambrook, todas supra), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn et al., Nature Biotechnology, 14 (3): 309-314 (1996) y PCT/US96/10287), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum C&EN, 18 de enero, página 33 (1993)); isoprenoides, patente de Estados Unidos 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, patente de Estados Unidos 5.549.974; pirrolidinas, patentes de EE.UU. 5.525.735 y 5.519.134; compuestos morfolinos, patente de Estados Unidos 5.506.337; y benzodiazepinas, Patente de Estados Unidos 5.288.514).

#### IV. Composiciones farmacéuticas y administración

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas o composiciones fisiológicas que comprenden una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe la señalización mediada por Smad3 y, por lo tanto, inhibe el desarrollo del cáncer, tal como un mutante dominante dominante de Smad3 o su ácido nucleico codificante, un ácido nucleico que codifica un antisentido o miRNA, miniRNA, un ARN largo no codificante dirigido a Smad3, un anticuerpo anti-Smad3 de inactivación, químicos pequeños, péptidos, proteínas, compuestos de extractos naturales de hierbas o SIS3, tanto en aplicaciones profilácticas como terapéuticas. Tales composiciones farmacéuticas o fisiológicas también incluyen uno o más excipientes o vehículos farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para uso en una diversidad de sistemas de administración de fármacos. Las formulaciones adecuadas para uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17<sup>a</sup> ed. (1985). Para una breve revisión de los métodos para la administración de fármacos, véase, Langer, Science 249: 1527-1533 (1990).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar por diversas vías, por ejemplo, oral, subcutánea, transdérmica, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. Las vías preferidas para administrar las composiciones farmacéuticas son administración local a un órgano o tejido que padece una afección agravada por señalización mediada por TGF- $\beta$ /Smad3 (por ejemplo, inyección intratumoral a un tumor) con dosis diarias de aproximadamente 0,01 a 2.500 mg, preferiblemente 2,5 -500 mg, de un inhibidor de Smad3 para un humano adulto de 70 kg por día. La dosis apropiada puede administrarse en una sola dosis diaria o como dosis divididas presentadas a intervalos apropiados, por ejemplo, tal como dos, tres, cuatro o más subdosis por día.

Para preparar composiciones farmacéuticas que contienen un inhibidor de Smad3 tal como SIS3, se usan vehículos inertes y farmacéuticamente aceptables. El portador farmacéutico puede ser sólido o líquido. Las preparaciones en forma sólida incluyen, por ejemplo, polvos, comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, cápsulas lisas y supositorios. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes o agentes de desintegración de comprimidos; también puede ser un material encapsulante.

En polvos, el vehículo es generalmente un sólido finamente dividido que está en una mezcla con el componente activo finamente dividido SIS3. En comprimidos, el ingrediente activo (un inhibidor de la señalización de TGF- $\beta$ /Smad3) se mezcla con el vehículo que tiene las propiedades de unión necesarias en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados.

Para preparar composiciones farmacéuticas en forma de supositorios, se funde primero una cera de bajo punto de fusión tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos y manteca de cacao y el ingrediente activo se dispersa en la misma, por ejemplo, mediante agitación. La mezcla homogénea fundida luego se vierte en moldes de tamaño conveniente y se deja enfriar y solidificar.

Los polvos y comprimidos contienen preferiblemente entre aproximadamente 5% y aproximadamente 70% en peso del ingrediente activo de un inhibidor de la señalización mediada por Smad3. Los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, lactosa, azúcar, pectina, dextrina, almidón, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir la formulación del compuesto activo de un inhibidor de Smad3 con material de encapsulación como un vehículo que proporciona una cápsula en la que el inhibidor (con o sin otros vehículos) está rodeado por el vehículo, de modo que el vehículo está así asociado con el compuesto. De manera similar, las cápsulas lisas también se pueden incluir. Los comprimidos, polvos, cápsulas lisas y cápsulas se pueden usar como formas de dosificación sólidas adecuadas para administración oral.

Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen, por ejemplo, soluciones adecuadas para administración oral o parenteral, suspensiones y emulsiones adecuadas para administración oral. Las soluciones acuosas estériles del componente activo (por ejemplo, un inhibidor de Smad3 tal como SIS3) o soluciones estériles del componente activo en disolventes que comprenden agua, agua regulada, solución salina, PBS, etanol o propilenglicol son ejemplos de composiciones líquidas adecuadas para administración parenteral. Las composiciones pueden contener sustancias

auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar las condiciones fisiológicas, tales como los agentes de ajuste del pH y de regulación, los agentes de ajuste de la tonicidad, los agentes humectantes, los detergentes y similares.

5 Las soluciones estériles se pueden preparar disolviendo el componente activo (por ejemplo, un inhibidor de la señalización de Smad3) en el sistema disolvente deseado, y luego pasando la solución resultante a través de un filtro de membrana para esterilizarlo o, alternativamente, disolviendo el compuesto estéril en un disolvente previamente esterilizado bajo condiciones estériles. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para usarse tal cual, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones típicamente estará entre 3 y 11, más preferiblemente entre 5 y 9, y lo  
10 más preferiblemente entre 7 y 8.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un inhibidor de Smad3 pueden administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que ya padece una afección que puede verse exacerbada por la señalización celular mediada por TGF- $\beta$ /Smad3 en una cantidad suficiente para prevenir, curar, revertir, o al menos ralentizar o detener los síntomas de la condición y sus complicaciones, como el inicio, la progresión y la metástasis de ciertos tipos de cáncer. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad o condición y del peso y estado general del paciente, pero generalmente varían de aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 2.500 mg del inhibidor por día para un paciente de 70 kg, con dosis de aproximadamente 2,5 mg hasta aproximadamente 500 mg del inhibidor por día para un paciente de 70 kg que se usa con más frecuencia.  
15  
20

En aplicaciones profilácticas, las composiciones farmacéuticas que contienen un inhibidor de Smad3 se administran a un paciente susceptible o en peligro de desarrollar una enfermedad o afección en la que no se desea una señalización excesiva mediada por TGF- $\beta$ /Smad3, en una cantidad suficiente para retrasar o prevenir el inicio de los síntomas. Dicha cantidad se define como una "dosis profilácticamente efectiva". En este uso, las cantidades precisas del inhibidor dependen nuevamente del estado de salud y peso del paciente, pero generalmente varían de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 2.500 mg del inhibidor para un paciente de 70 kg por día, más comúnmente de aproximadamente 2,5 mg a aproximadamente 500 mg para un paciente de 70 kg por día.  
25

Se pueden llevar a cabo administraciones únicas o múltiples de las composiciones con niveles de dosis y de patrón seleccionados por el médico tratante. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas deberían proporcionar una cantidad de un inhibidor de Smad3 suficiente para inhibir eficazmente la señalización celular mediada por Smad3 en el paciente, ya sea de forma terapéutica o profiláctica.  
30

#### V. Aplicaciones terapéuticas usando ácidos nucleicos

Se puede tratar una variedad de cánceres mediante enfoques terapéuticos que involucran la introducción de un ácido nucleico que codifica un inhibidor polipeptídico de la señalización de Smad3 o una secuencia de oligonucleótidos pequeña (tal como antisentido o miARN) en una célula de tal manera que la secuencia codificante se transcribe y el polipéptido o inhibidor de oligonucleótidos se produce en la célula. Los tipos de cánceres susceptibles de tratamiento con este enfoque incluyen un amplio espectro de tumores sólidos, cuya supervivencia y crecimiento dependen en cierta medida de la señalización continua de TGF- $\beta$ /Smad3. Para discusiones sobre la aplicación de la terapia génica en el tratamiento de enfermedades tanto genéticas como adquiridas, véase, Miller Nature 357: 455-460 (1992); y Mulligan Science 260: 926-932 (1993).  
35  
40

#### A. Vectores para el suministro de genes

Para el suministro a una célula u organismo, de un polinucleótido que codifica un polipéptido que inhibe la señalización de Smad3 (tal como un mutante negativo dominante de Smad3 o un anticuerpo de Smad3 de inactivación) o que codifica un oligonucleótido inhibidor (tal como antisentido o miARN) puede incorporarse a un vector. Ejemplos de vectores utilizados para tales fines incluyen plásmidos de expresión capaces de dirigir la expresión de los ácidos nucleicos en la célula diana. En otros casos, el vector es un sistema de vector viral en el que el polinucleótido se incorpora a un genoma viral que es capaz de transfectar la célula diana. En una realización, el polinucleótido codificante puede unirse operativamente a secuencias de expresión y control que pueden dirigir la expresión del polipéptido u oligonucleótido en las células huésped diana deseadas. Por lo tanto, se puede lograr la expresión del polipéptido o inhibidor de oligonucleótido en condiciones apropiadas en la célula diana.  
45  
50

#### B. Sistemas de suministro de genes

Los sistemas de vectores virales útiles en la expresión de un polipéptido o inhibidor de oligonucleótidos de la señalización celular mediada por Smad3 incluyen, por ejemplo, sistemas de vectores virales de origen natural o recombinantes. Dependiendo de la aplicación particular, los vectores virales adecuados incluyen replicación competente, replicación deficiente, y vectores virales condicionalmente replicantes. Por ejemplo, los vectores virales se pueden derivar del genoma de adenovirus humanos, bovinos, virus de la vacuna, virus del herpes, virus adenoasociados, virus diminutos de ratones (MVM), VIH, virus de sindbis y retrovirus (incluidos, pero no limitados a virus del sarcoma Rous), y MoMLV. Típicamente, la secuencia codificante de interés (por ejemplo, una que codifica  
55

para un polipéptido o un inhibidor de oligonucleótido de la presente invención) se inserta en tales vectores para permitir el empaquetamiento del constructo genético, típicamente con el ADN viral que lo acompaña, seguido de la infección de una célula huésped sensible y expresión de la secuencia codificante de interés.

5 Como se usa en el presente documento, "sistema de suministro de genes" se refiere a cualquier medio para el suministro de una secuencia de polinucleótidos de la invención a una célula diana. En algunas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos se conjugan con un ligando de receptor celular para facilitar la captación (por ejemplo, invaginación de fosas recubiertas e internalización del endosoma) a través de una fracción de enlace apropiado, tal como una fracción de enlace de ADN (Wu et al., J. Biol. Chem. 263: 14621-14624 (1988); WO 92/06180), o mediante un sistema de administración de microburbujas por ultrasonido (Lan HY et al., J. Am Soc. Nephrol. 14: 1535-1548). Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden enlazarse a través de una fracción de polilisina a asialo-*oromucoid*, que es un ligando para el receptor de asialoglicoproteínas de los hepatocitos.

15 De manera similar, las envolturas virales utilizadas para empaquetar constructos de genes que incluyen los ácidos nucleicos de la invención pueden modificarse mediante la adición de ligandos de receptores o anticuerpos específicos para un receptor que permita la endocitosis mediada por receptores en células específicas (véase, por ejemplo, el documento WO 93/20221), WO 93/14188, y WO 94/06923). En algunas realizaciones de la invención, los constructos de ADN de la invención están enlazados a proteínas virales, tales como partículas de adenovirus, para facilitar la endocitosis (Curiel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8850-8854 (1991)). En otras realizaciones, los conjugados moleculares de la presente invención pueden incluir inhibidores de microtúbulos (WO/9406922), péptidos sintéticos que simulan la hemaglutinina del virus de la gripe (Plank et al., J. Biol. Chem. 269: 12918-12924 (1994)), y señales de localización nuclear tal como el antígeno SV40 T (WO93/19768).

25 Los vectores retrovirales también pueden ser útiles para introducir la secuencia codificante de un polipéptido o inhibidor de oligonucleótido de la invención en células u organismos diana. Los vectores retrovirales se producen mediante la manipulación genética de los retrovirus. El genoma viral de los retrovirus es el ARN. Tras la infección, este ARN genómico se transcribe a la inversa en una copia de ADN que se integra en el ADN cromosómico de las células transducidas con un alto grado de estabilidad y eficiencia. La copia de ADN integrada se conoce como provirus y es heredada por las células hijas como cualquier otro gen. El genoma retroviral de tipo silvestre y el ADN proviral tienen tres genes: los genes gag, el pol y el env, que están flanqueados por dos secuencias largas de repetición terminal (LTR). El gen gag codifica las proteínas estructurales internas (nucleocápside); el gen pol codifica la ADN polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa reversa); y el gen env codifica las glicoproteínas de la envoltura viral. Las LTR 5' y 3' sirven para promover la transcripción y la poliadenilación de los ARN del virión. Adyacente a la LTR 5' hay secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión del cebador tRNA) y para la encapsulación eficiente del ARN viral en partículas (el sitio Psi) (véase, Mulligan, In: Experimental Manipulation of Gene Expression, Inouye (ed), 155-173 (1983); Mann et al., Cell 33:153-159 (1983); Cone and Mulligan, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 81:6349-6353 (1984)).

35 El diseño de vectores retrovirales es bien conocido por los expertos en la técnica. En resumen, si las secuencias necesarias para la encapsidación (o el empaquetamiento del ARN retroviral en viriones infecciosos) faltan en el genoma viral, el resultado es un defecto que actúa en cis que evita la encapsidación del ARN genómico. Sin embargo, el mutante resultante aún es capaz de dirigir la síntesis de todas las proteínas viriónicas. Los genomas retrovirales de los que se han eliminado estas secuencias, así como las líneas celulares que contienen el genoma mutante integrado de manera estable en el cromosoma, son bien conocidas en la técnica y se utilizan para construir vectores retrovirales. La preparación de vectores retrovirales y sus usos se describen en muchas publicaciones que incluyen, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea EPA 0 178 220; Patente de Estados Unidos 4.405.712, Gilboa Biotechniques 4:504-512 (1986); Mann et al., Cell 33:153-159 (1983); Cone and Mulligan Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349-6353 (1984); Eglitis et al. Biotechniques 6:608-614 (1988); Miller et al. Biotechniques 7:981-990 (1989); Miller (1992) *supra*; Mulligan (1993), *supra*; y WO 92/07943.

45 Las partículas de vectores retrovirales se preparan insertando de forma recombinante la secuencia de nucleótidos deseada en un vector de retrovirus y empaquetando el vector con proteínas de la cápside retroviral mediante el uso de una línea celular de empaquetamiento. La partícula de vector retroviral resultante es incapaz de replicarse en la célula huésped pero es capaz de integrarse en el genoma de la célula huésped como una secuencia proviral que contiene la secuencia de nucleótidos deseada. Como resultado, el paciente es capaz de producir, por ejemplo, un polipéptido o polinucleótido de la invención y así restaurar las células a un fenotipo normal.

50 Las líneas celulares de empaquetamiento que se utilizan para preparar las partículas del vector retroviral son típicamente líneas celulares de cultivo de tejidos de mamíferos recombinantes que producen las proteínas estructurales virales necesarias para el empaquetamiento, pero que son incapaces de producir viriones infecciosos. Los vectores retrovirales defectuosos que se utilizan, por otro lado, carecen de estos genes estructurales pero codifican las proteínas restantes necesarias para el empaquetamiento. Para preparar una línea celular de empaquetamiento, se puede construir un clon infeccioso de un retrovirus deseado en el que se haya eliminado el sitio de empaquetamiento. Las células que comprenden este constructo expresarán todas las proteínas virales estructurales, pero el ADN introducido será incapaz de ser empaquetado. Alternativamente, las líneas celulares de empaquetamiento pueden producirse transformando una línea celular con uno o más plásmidos de expresión que codifican las proteínas de envoltura y núcleo apropiadas. En estas células, los genes gag, pol y env pueden

derivarse de los mismos o diferentes retrovirus.

Una serie de líneas celulares de empaquetamiento adecuadas para la presente invención también están disponibles en la técnica anterior. Ejemplos de estas líneas celulares incluyen Crip, GPE86, PA317 y PG13 (véase Miller et al., J. Virol. 65: 2220-2224 (1991)). Ejemplos de otras líneas celulares de empaquetamiento se describen en Cone and Mulligan Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 81:6349-6353 (1984); Danos and Mulligan Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 85:6460-6464 (1988); Eglitis et al. (1988), *supra*; and Miller (1990), *supra*.

Se pueden usar líneas celulares de empaquetamiento capaces de producir partículas de vectores retrovirales con proteínas de envoltura quiméricas. Alternativamente, se pueden usar proteínas de envoltura anfotrópica o xenotrópica, tales como las producidas por las líneas celulares de empaquetamiento PA317 y GPX para empaquetar los vectores retrovirales.

#### C. formulaciones farmacéuticas

Cuando se utiliza con fines farmacéuticos, el ácido nucleico que codifica un polipéptido u oligonucleótido inhibidor de Smad3 generalmente se formula en un regulador adecuado, que puede ser cualquier regulador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina regulada con fosfato o fosfato de sodio/sulfato de sodio, regulador Tris, regulador glicina, agua estéril y otros reguladores conocidos por los expertos en la técnica tales como los descritos por Good et al. Biochemistry 5: 467 (1966).

Las composiciones pueden incluir adicionalmente un estabilizador, potenciador u otros portadores o vehículos farmacéuticamente aceptables. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede contener un compuesto fisiológicamente aceptable que actúa, por ejemplo, para estabilizar los ácidos nucleicos de la invención y cualquier vector asociado. Un compuesto fisiológicamente aceptable puede incluir, por ejemplo, hidratos de carbono, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizantes o excipientes. Otros compuestos fisiológicamente aceptables incluyen agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes o conservantes, que son particularmente útiles para prevenir el crecimiento o la acción de microorganismos. Diversos conservantes son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, fenol y ácido ascórbico. Se pueden encontrar ejemplos de portadores, estabilizantes o adyuvantes en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17<sup>a</sup> ed. (1985).

#### D. Administración de Formulaciones

Las formulaciones que contienen una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido o un inhibidor de oligonucleótidos de Smad3 pueden administrarse a cualquier tejido u órgano utilizando cualquier método de administración conocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones de la invención, las secuencias de polinucleótidos codificantes se formulan para inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal o intratumoral, o para ingestión oral o para aplicación tópica.

Las formulaciones que contienen el ácido nucleico de la invención se administran típicamente a una célula. La célula se puede proporcionar como parte de un tejido, tal como una membrana epitelial, o como una célula aislada, tal como en un cultivo de tejidos. La célula se puede proporcionar in vivo, ex vivo o in vitro.

Las formulaciones se pueden introducir en el tejido de interés in vivo o ex vivo mediante una variedad de métodos. En algunas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos de la invención se introducen en células mediante métodos tales como microinyección, precipitación con fosfato de calcio, fusión de liposomas, ultrasonido, electroporación o biolística. En realizaciones adicionales, los ácidos nucleicos son absorbidos directamente por el tejido de interés, por ejemplo, cuando el tejido objetivo es la piel.

En algunas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos de la invención se administran ex vivo a células o tejidos explantados de un paciente, y luego se devuelven al paciente. Ejemplos de administración ex vivo de constructos génicos terapéuticos incluyen Nolta et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 93(6):2414-9 (1996); Koc et al., Seminars in Oncology 23(1):46-65 (1996); Raper et al., Annals of Surgery 223(2):116-26 (1996); Dalesandro et al., J. Thorac. Cardi. Surg., 11(2):416-22 (1996); y Makarov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(1):402-6 (1996).

La dosificación efectiva de las formulaciones variará dependiendo de muchos factores diferentes, incluidos los medios de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente y otros medicamentos administrados. Por lo tanto, las dosificaciones de tratamiento deberán ajustarse para optimizar la seguridad y la eficacia. Al determinar la cantidad efectiva del vector que se va a administrar, el médico debe evaluar el ácido nucleico particular utilizado, diagnosticándose el estado de la enfermedad; la edad, el peso y el estado general del paciente, los niveles plasmáticos circulantes, las toxicidades del vector, la progresión de la enfermedad y la producción de anticuerpos anti-vector. El tamaño de la dosis también estará determinado por la existencia, la naturaleza y el alcance de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración de un vector en particular. Para practicar la presente invención, son típicas las dosis de SIS3 que oscilan entre aproximadamente 0.1 µg y 100 mg por paciente. Las dosis generalmente varían entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 100 µg por kilogramo de peso

corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 50 µg/kg de peso corporal o aproximadamente  $10^8$ - $10^{10}$  o  $10^{12}$  partículas por inyección. En general, la dosis equivalente de un ácido nucleico desnudo de un vector es de aproximadamente 1 µg - 100 µg para un paciente típico de 70 kg, y las dosis de vectores que incluyen una partícula retroviral se calculan para producir una cantidad equivalente de ácido nucleico que codifica un polipéptido u oligonucleótido que inhibe la transducción de señales mediada por Smad3.

## VI. KITS

La invención también proporciona kits para inhibir la señalización de Smad3 y, por lo tanto, para tratar el cáncer de acuerdo con el método de la presente invención. Los kits típicamente incluyen un recipiente que contiene (1) una composición farmacéutica que tiene una cantidad efectiva de un inhibidor de la señalización mediada por Smad3 (por ejemplo, un mutante Smad3 dominante negativo, una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido mutante, un polinucleótido que codifica un antisentido o miARN contra Smad3, un anticuerpo inactivador de Smad3 o un inhibidor de molécula pequeña de Smad3 tal como SIS3) y (2) material informativo que contiene instrucciones sobre cómo dispensar la composición farmacéutica, incluida la descripción del tipo de pacientes que pueden tratarse (por ejemplo, pacientes con cáncer con señalización excesiva de TGF-β/Smad3), la programación (por ejemplo, dosis y frecuencia) y la vía de administración, y similares.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración solamente y no a modo de limitación. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir esencialmente los mismos resultados o resultados similares.

#### Ejemplo 1: tratamiento con SIS3 de carcinoma de pulmón y melanoma

El efecto terapéutico de SIS3 se probó en el modelo de ratón invasivo subcutáneo de carcinoma de pulmón y melanoma. Las células de carcinoma de pulmón de ratón altamente invasivas (LLC-luc) y las células de melanoma (B16F10-luc) marcadas con luciferasa se inyectaron subcutáneamente en ratones C57/BL6 genéticamente idénticos con una dosis de 2 millones de células en 200 µL de PBS por ratón. El crecimiento, invasión y metástasis del cáncer se monitorizaron midiendo el tamaño del tumor, el peso y las imágenes bioluminiscentes semanalmente. Después de que se estableció el cáncer una semana después de la implantación, los ratones portadores de tumores recibieron SIS3 por vía intraperitoneal en dosis de 2,5, 5 y 10 µg/Kg de peso corporal por día durante 2 semanas. Los animales de control recibieron solución salina diariamente, en lugar de SIS3, y también se monitorizó un grupo de ratones portadores de tumores sin ningún tratamiento (usado como controles no tratados). Se usaron cinco ratones por grupo en este estudio. Los ratones se pesaron y el tamaño del tumor o la metástasis se examinaron mediante imágenes bioluminiscentes in vivo semanalmente. Se registró la tasa de supervivencia. Todos los ratones se sacrificaron 2 semanas después del tratamiento para un examen adicional por histología y volumen y peso tumoral, invasión y metástasis.

Este estudio proporciona evidencia que respalda una nueva terapia contra el cáncer mediante direccionamiento a TGF-β/Smad3 con un inhibidor de Smad3 (SIS3). Como se muestra en las Figuras 1 y 2, los ratones nulos para Smad3 estaban protegidos contra el crecimiento, invasión, metástasis y muerte por cáncer en dos modelos de cáncer altamente invasivos que incluyen carcinoma de pulmón (LLC) y melanoma (B16F10). Los resultados de estos estudios demostraron claramente que los microambientes dependientes de Smad3 determinaron y promovieron el crecimiento, la invasión, metástasis y muerte por cáncer, proporcionando una fuerte evidencia para el desarrollo de una nueva terapia contra el cáncer mediante el uso del inhibidor de Smad3. Esto fue desarrollado por esta invención que suprimió el tratamiento con un inhibidor de Smad3 (SIS3), tanto en carcinoma de pulmón (LLC) como melanoma (B16F10), crecimiento de cáncer e invasión en los tejidos que rodean el cáncer y metástasis en tejido de ganglios linfáticos, pulmón, hígado, gástrico y de colon de una manera dependiente de la dosis, y por lo tanto previno la muerte por cáncer (Figuras 3-7). De este modo, la presente invención indica a SIS3 como un nuevo agente anticanceroso eficaz mediante la regulación de la transducción de señal celular mediada por TGF-β/Smad3.

Todas las patentes, solicitudes de patentes y otras publicaciones, incluidos los números de acceso de GenBank, citados en esta solicitud, se incorporan como referencia en su totalidad para todos los fines.

La invención también divulga a lo que sigue

1. Un método para inhibir la proliferación de una célula, que comprende la etapa de poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un inhibidor de Smad3.
2. El método del ítem 1, en el que la célula está dentro de un cuerpo humano.
3. El método del ítem 1, en el que la célula es una célula cancerosa.
4. El método del ítem 3, en el que la célula cancerosa está dentro de un cuerpo humano.
5. El método del ítem 3, en el que el cáncer es carcinoma de pulmón o melanoma.

6. El método del ítem 1, en el que el inhibidor es SIS3.
7. El método del ítem 1, en el que el inhibidor es un anticuerpo neutralizante contra Smad3, un péptido, un siARN, un microARN, un miniARN, un incARN, un oligonucleótido antisentido o una molécula pequeña.
- 5 8. El método del ítem 2, en el que la etapa de contacto comprende la administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal u oral.
9. El método del ítem 4, en el que la etapa de contacto comprende la administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal u oral.
10. El método del ítem 1, en el que el inhibidor se administra en forma de una solución, un polvo, una pasta, un comprimido o una cápsula.
- 10 11. Una composición que comprende una cantidad efectiva de un inhibidor de Smad3 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
12. La composición del ítem 11, que está formulada para administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, tópica u oral.
13. La composición del ítem 11, que es una solución, un polvo, una pasta, un comprimido o una cápsula.
- 15 14. Un kit para inhibir la proliferación de una célula, que comprende la composición del ítem 10.
15. El kit del ítem 14, en el que la composición está formulada para administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, tópica u oral.
16. El kit del ítem 15, que comprende además un manual de instrucciones para la administración de la primera y segunda composiciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un inhibidor de Smad3 para su uso en el tratamiento de un cáncer seleccionado de melanoma y carcinoma de pulmón.
2. El inhibidor para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer es un melanoma.
- 5 3. El inhibidor para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cáncer es carcinoma de pulmón.
4. El inhibidor para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se selecciona de: un anticuerpo neutralizante contra Smad3, un péptido, un ARNip, un microARN, un miniARN, un lncARN y un oligonucleótido antisentido.
- 10 5. El inhibidor para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que está formulado para administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, tópica u oral.
6. El inhibidor para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el inhibidor se administra en forma de una solución, un polvo, una pasta, un comprimido o una cápsula.

Figura 1

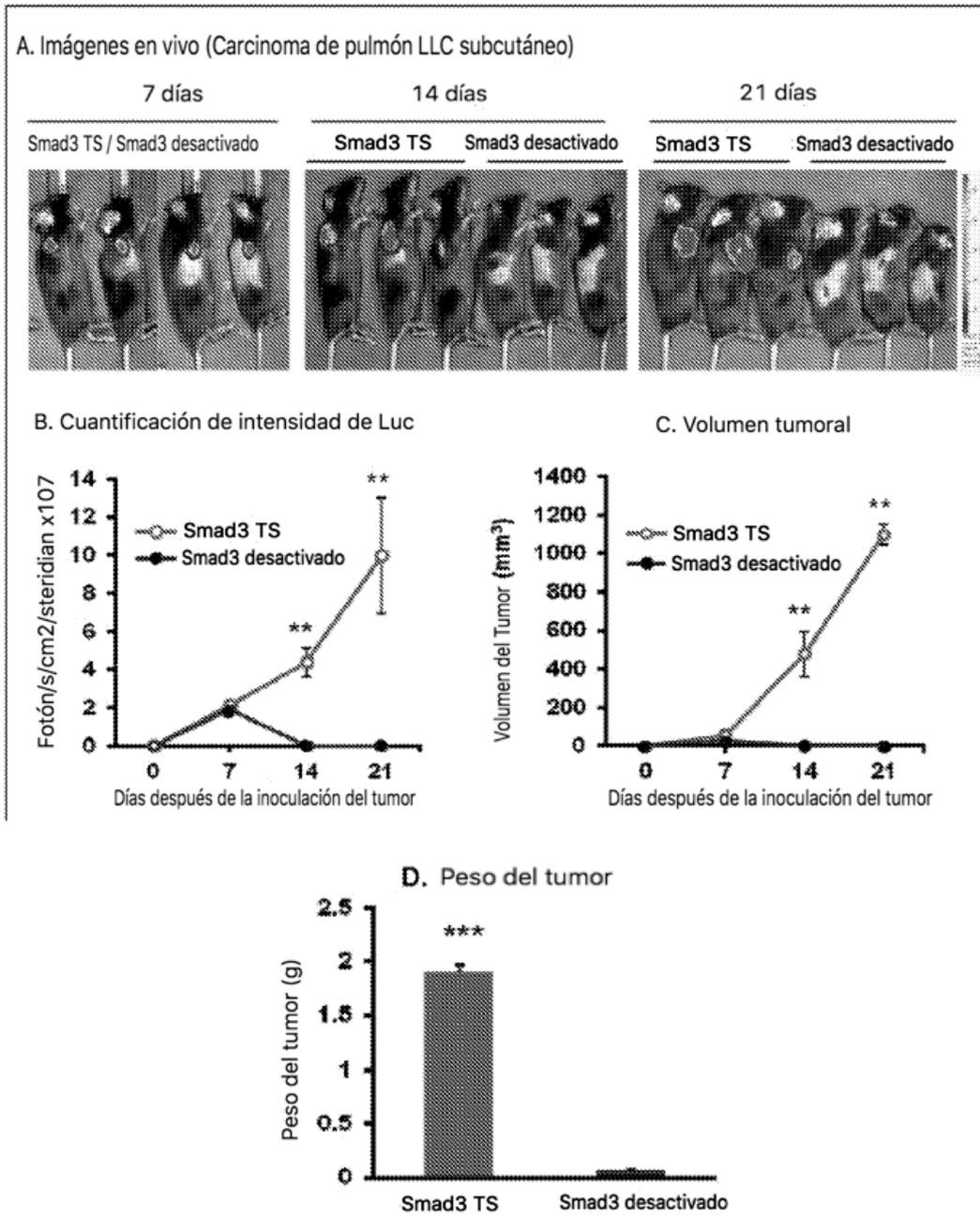


Figura 2

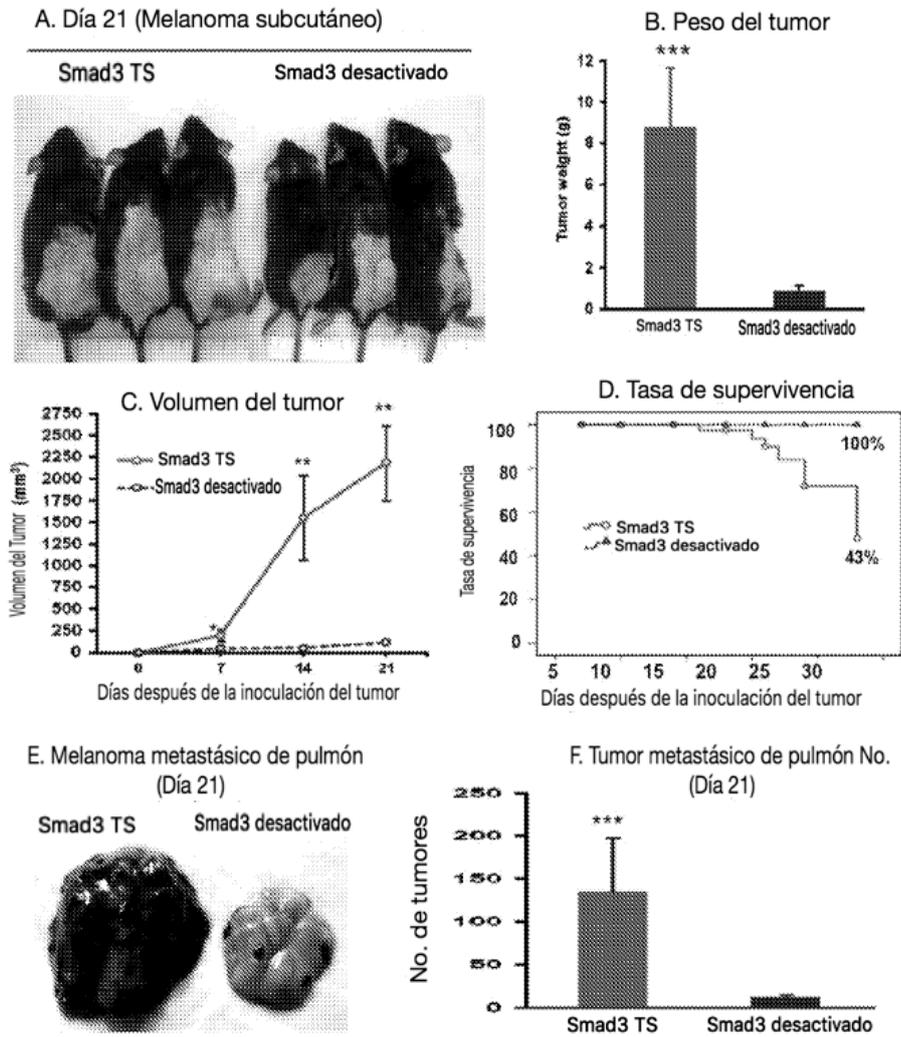


Figura 3

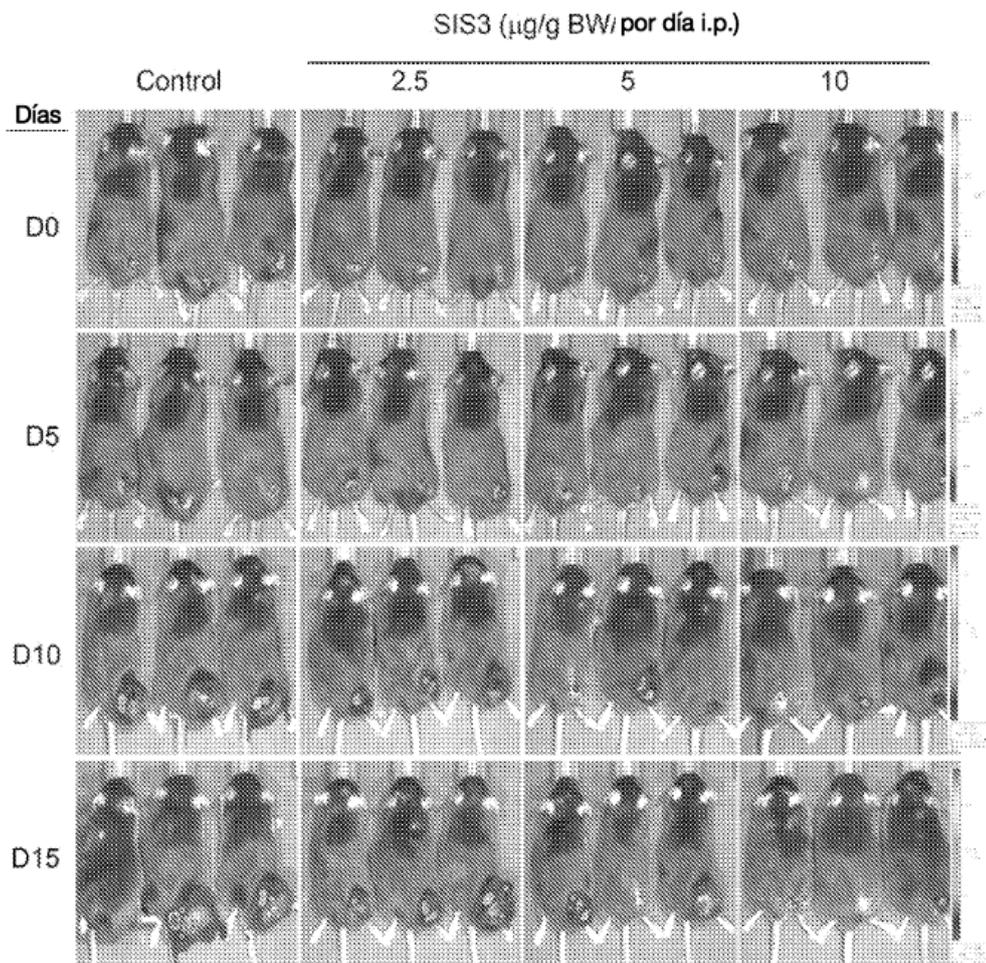


Figura 4

Peso del tumor (melanoma B16F10)

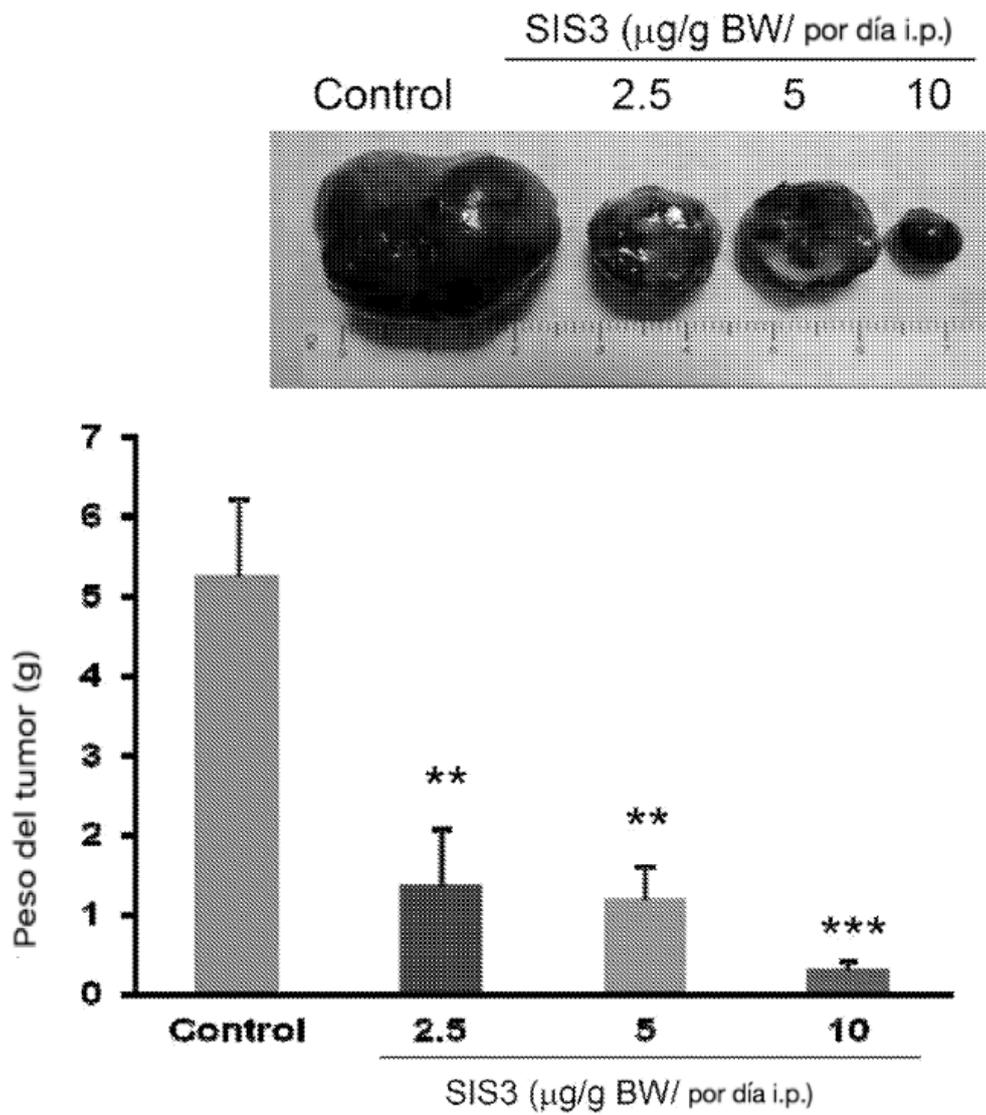


Figura 5

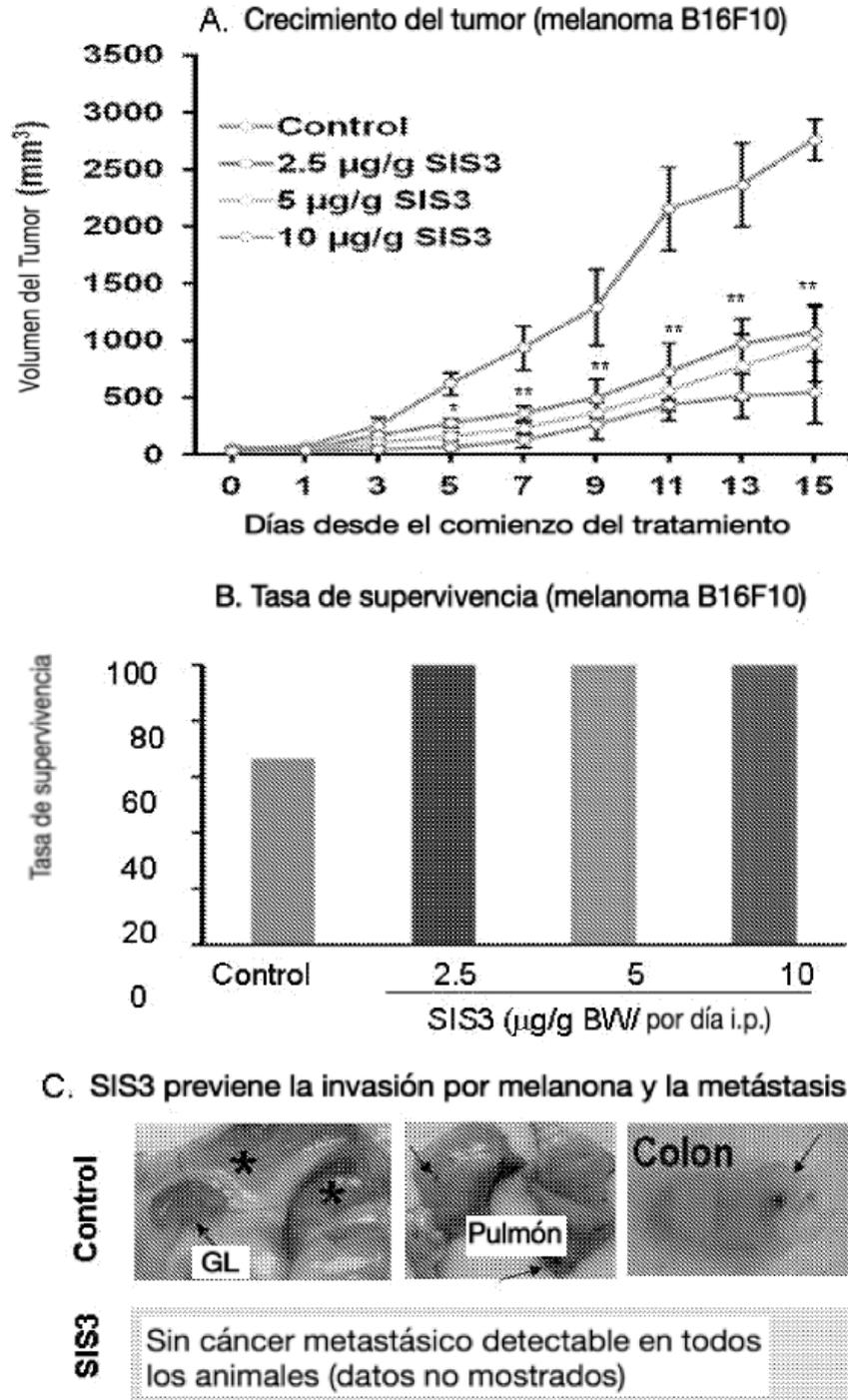
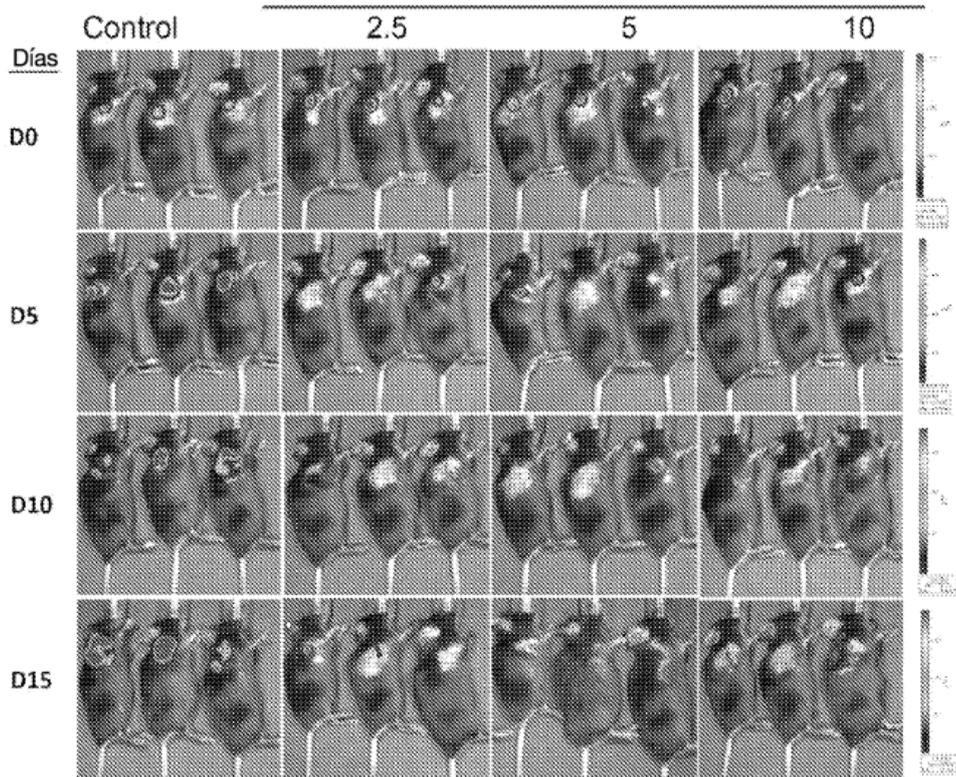


Figura 6

A. Crecimiento del tumor (Carcinoma de pulmón LLC)  
 SIS3 ( $\mu\text{g/g BW}$ /por día i.p.)



B. Volumen del tumor (Carcinoma de pulmón LLC)

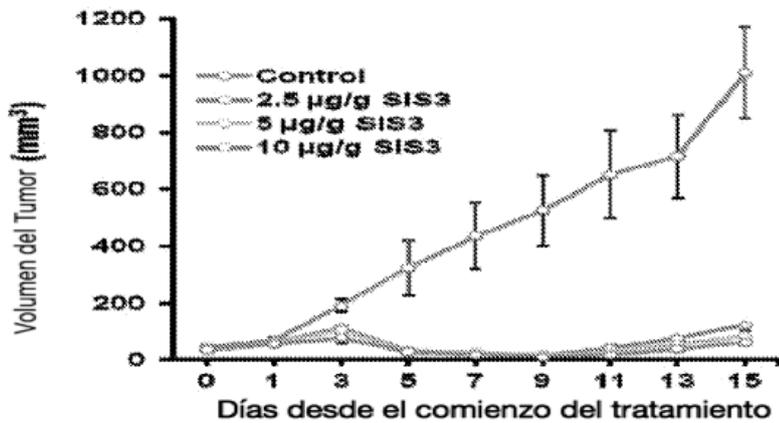
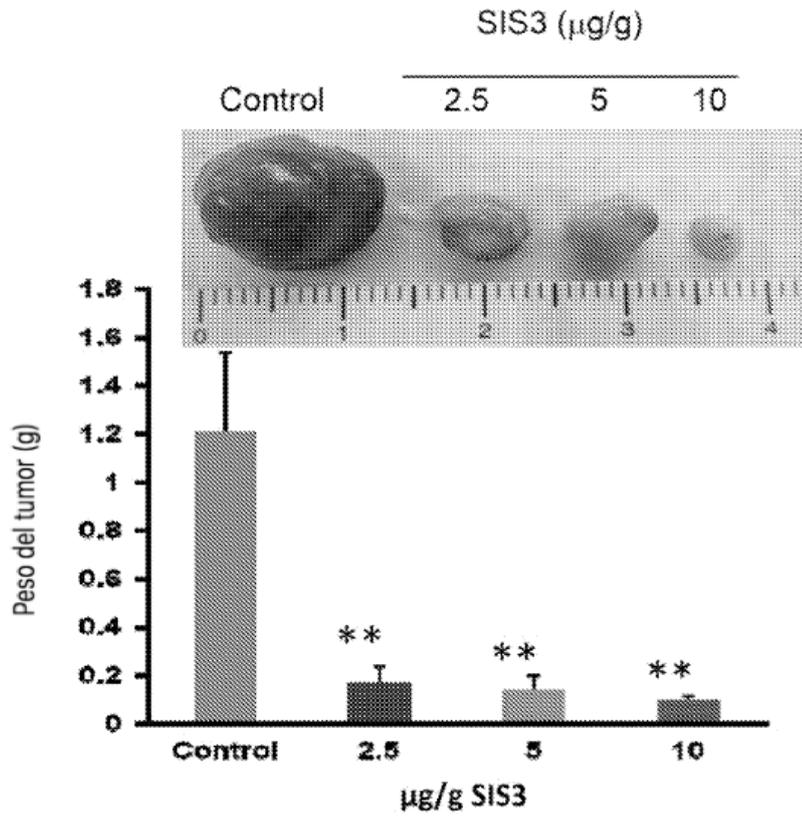


Figura 7

A. Peso del cáncer de pulmón LLC



B. Tasa de supervivencia del cáncer de pulmón LLC

