

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 840**

51 Int. Cl.:

C07K 16/44 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/475 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 33/24 (2009.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2012 PCT/US2012/031860**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12135831**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2012 E 12722943 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2694555**

54 Título: **Anticuerpos anti-ADN que penetran en las células y usos de los mismos para inhibir la reparación del ADN**

30 Prioridad:
01.04.2011 US 201161470918 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2020

73 Titular/es:
**YALE UNIVERSITY (33.3%)
Two Whitney Avenue
New Haven, CT 06510, US;
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (33.3%) y
UNITED STATES GOVERNMENT REPRESENTED
BY THE DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS
(33.3%)**

72 Inventor/es:
**HANSEN, JAMES, E.;
GLAZER, PETER, M.;
WEISBART, RICHARD, H.;
NISHIMURA, ROBERT, N. y
CHAN, GRACE**

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 744 840 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

Anticuerpos anti-ADN que penetran en las células y usos de los mismos para inhibir la reparación del ADN

5 Investigación o desarrollo

Esta invención fue realizada con el apoyo del gobierno en virtud del Acuerdo P01 CA129186 otorgado a Peter Glazer por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente al campo de la terapia con anticuerpos para el tratamiento del cáncer, y más particularmente al uso de anticuerpos anti-ADN que penetran en las células para inhibir la reparación del ADN, sensibilizar las células a la radioterapia y la quimioterapia que daña el ADN, y destruir selectivamente células cancerosas con deficiencias preexistentes en la reparación del ADN.

Antecedentes de la invención

La mayoría de las terapias contra el cáncer están severamente limitadas por efectos secundarios significativos debido a la toxicidad tisular inespecífica, y la identificación de agentes novedosos que son selectivamente tóxicos para las células cancerosas o sensibilizan selectivamente los tumores al tratamiento es un objetivo clave en la investigación del cáncer. Una cantidad significativa de trabajo se ha centrado en aplicar la actividad de unión específica de los anticuerpos monoclonales al desarrollo de terapias específicas para tumores. Los anticuerpos seleccionados como trastuzumab (Herceptin®), rituximab (Rituxan®) y cetuximab (Erbix®) han recibido la aprobación para su uso en la terapia contra el cáncer humano, pero todos carecen de la capacidad de penetrar en las células cancerosas y, por lo tanto, están limitados a atacar objetivos localizados en la superficie externa de las células tumorales.

Un número significativo de dianas del tumor se encuentran dentro de las células y los núcleos, y numerosos tipos de cáncer son particularmente vulnerables a los tratamientos que inhiben la reparación del ADN. El documento WO2009134027 describe un anticuerpo anti-ácido nucleico, 3D8 scFv, que tiene la capacidad de unirse y degradar ADN y ARN (es decir, tiene actividad nucleasa, §29, para su uso en una composición para prevenir o tratar cánceres, el Ab representa un componente eficaz que tiene actividad de nucleasa y actividad de permeación celular al mismo tiempo. No se da ningún dato sobre cómo se identificó/aisló el scFv 3D8.

El documento WO2008091911 divulga el anticuerpo 3E10 (número de registro ATCC PTA 2439) para su uso en el tratamiento del cáncer mediante la inducción de la detención del crecimiento o apoptosis que comprende: administrar al sujeto un conjugado de Ab que comprende 3E10 y una molécula biológicamente activa, en la que la molécula biológicamente activa es capaz de inducir la detención del crecimiento o apoptosis, en la que el conjugado de anticuerpo se transporta a la célula cancerosa, induciendo así la detención del crecimiento o la apoptosis en la célula cancerosa. La evidencia experimental se proporciona utilizando un 3E10 Fv acoplado a p53.

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones y cualquier otro aspecto o realización expuestos en el presente documento que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones es solo a nivel informativo. Se han desarrollado métodos para su uso anticuerpos anti-ADN para penetrar en los núcleos celulares e inhibir la reparación del ADN. En realizaciones preferidas, la célula es una neoplasia, normalmente una célula cancerosa tal como un carcinoma. El método de tratamiento de células cancerosas o ciertas células infectadas implica el contacto de las células con los anticuerpos anti-ADN que penetran en las células, solos o en combinación con otros agentes tales como agentes quimioterapéuticos o radiación, siempre que el anticuerpo no esté conjugado con el agente terapéutico.

En algunas realizaciones, el método implica analizar un sujeto o tumor para detectar una o más mutaciones o alteraciones génicas en la expresión génica normal que alteran la reparación del ADN, y a continuación seleccionar los anticuerpos anti-ADN para su uso en el tratamiento de las células si se identifican la una o más mutaciones o patrones de expresión o función alterados.

Las células con reparación defectuosa del ADN son dianas particularmente buenas para este método. En realizaciones preferidas, las células son defectuosas en la expresión o tienen una mutación en un gen implicado en la reparación del ADN, los puntos de control del daño del ADN, la síntesis del ADN, la recombinación homóloga o la unión final no homóloga. Ejemplos de genes incluyen *XRCC1*, *ADPRT (PARP-1)*, *ADPRTL2 (PARP-2)*, *POLYMERASE BETA*, *CTPS*, *MLH1*, *MSH2*, *WRN*, *BLM*, *KU70*, *KU80*, *ATM*, *ATR*, *CHK1*, *CHK2*, *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCC*, *FANCD1*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *RAD1*, y *RAD9*. En algunas realizaciones, el gen defectuoso es un gen supresor de tumores. Por ejemplo, las células pueden tener una o más mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*.

Muchos procedimientos de terapia contra el cáncer, como la quimioterapia y la radioterapia, funcionan abrumando la capacidad de la célula para reparar el daño del ADN, lo que da como resulta la muerte celular. En algunas realizaciones, las células son resistentes a la radioterapia y/o quimioterapia. Los anticuerpos anti-ADN que penetran en las células también se proporcionan para su uso en métodos para mejorar la eficacia de la radioterapia y/o quimioterapia en un sujeto mediante la administración al sujeto de una composición que contiene anticuerpos anti-ADN que penetran en las células. En algunas realizaciones, los anticuerpos aumentan la sensibilidad de las células a la radioterapia y/o quimioterapia. Los agentes quimioterapéuticos que pueden mejorarse con este método incluyen aquellos que dañan el ADN o inhiben la reparación del ADN. Los anticuerpos anti-ADN pueden administrarse al sujeto antes, simultáneamente o después de la administración de radioterapia y/o quimioterapia. En realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-ADN se administran al sujeto al menos dos días antes o después de la radioterapia y/o quimioterapia, más preferiblemente al menos un día antes o después de la radioterapia y/o quimioterapia, e incluso más preferiblemente simultáneamente con la radioterapia y/o quimioterapia.

Se divulgan anticuerpos anti-ADN que penetran en las células que inhiben la reparación del ADN. Estos anticuerpos son transportados al núcleo de la célula sin la ayuda de un vehículo o conjugado. El anticuerpo anti-ADN puede en algunas realizaciones unirse al ADN de cadena sencilla (ADNcs), ADN de doble cadena (ADNdc) o una combinación de los mismos. Los anticuerpos específicos para el ADN de doble cadena (ADNdc) están presentes en el 70 % de los pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), en comparación con el 0,5 % de las personas sin LES. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el anticuerpo anti-ADN que penetra en las células se aísla o deriva de un sujeto con LES o un animal, como un ratón o conejo, con una condición autoinmunitaria similar, luego se humaniza o se expresa de forma recombinante y se administra como un dímero o anticuerpo de cadena sencilla.

Los anticuerpos anti-ADN que penetran en las células útiles son el anticuerpo monoclonal anti-ADN 3E10, o sus formas humanizadas. En realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-ADN es un fragmento variable de cadena sencilla de un anticuerpo anti-ADN, o una variante conservadora del mismo. Por ejemplo, el anticuerpo anti-ADN puede ser un fragmento variable de cadena sencilla de 3E10 (3E10 scFv), o una variante conservadora del mismo. El 3E10 scFv se produce preferiblemente como una proteína recombinante expresada a partir de un vector de expresión en una célula de mamífero, tal como levadura, por ejemplo, *Pichia pastoris*. Los anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos de longitud completa, anticuerpos de cadena sencilla y fragmentos de anticuerpos. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo monoclonal biespecífico que se une específicamente a una segunda diana terapéutica en el núcleo de la célula. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a una proteína en el núcleo de una célula tal como una proteína de reparación de ADN, una proteína de replicación de ADN, una proteína de respuesta al daño del ADN, una proteína reguladora del ciclo celular, una proteína de punto de control del daño del ADN, una proteína reguladora de la apoptosis, o una proteína de respuesta al estrés. Los ejemplos de dianas en estas categorías incluyen respectivamente proteína RAD52, proteína mutada de la ataxia telangiectasia (ATM), proteínas CHK2 o CHK1, proteína BCL2, proteína de choque térmico 70 (HSP70), proteína Myc y proteína Ras.

En una realización preferida, los anticuerpos anti-ADN que penetran en las células se proporcionan en una dosis unitaria en una cantidad eficaz para inhibir la reparación del ADN en un cáncer, que puede incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable en el mismo vial o por separado, en un kit, en el que los anticuerpos están presentes en una cantidad efectiva para inhibir la reparación del ADN en una célula cancerosa. En realizaciones preferidas, el anticuerpo está presente en una cantidad de aproximadamente 200 mg/m² hasta aproximadamente 1000 mg/m², incluyendo aproximadamente 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 mg/m². En algunas realizaciones, la composición farmacéutica está en una forma farmacéutica unitaria para inyección intravenosa. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica está en una forma farmacéutica unitaria para inyección intratumoral.

La composición farmacéutica (por ejemplo, forma farmacéutica) puede contener adicionalmente, o puede proporcionarse en un kit con agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, el agente terapéutico adicional puede ser un agente antineoplásico, un agente radiosensibilizador o una combinación de los mismos. Preferiblemente, el agente antineoplásico daña el ADN o inhibe la reparación del ADN. En algunas realizaciones, el agente antineoplásico es cisplatino, citoxano, doxorubicina, metotrexato, mitomicina c, mostaza nitrogenada, un inhibidor de la ribonucleótido reductasa (por ejemplo, hidroxiaurea), tirapazamina, temozolomida o un inhibidor de la topoisomerasa (por ejemplo, camptotecina).

Los ejemplos no limitantes de radiosensibilizadores que pueden estar presentes en la composición farmacéutica incluyen cisplatino, doxorubicina, gemcitabina, 5-fluorouracilo, inhibidores de la PARP1, inhibidores de la histona desacetilasa, inhibidores del proteasoma, inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), inhibidores del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), inhibidores de CHK1, inhibidores de mTOR, inhibidores de quinasas, pentoxifilina y vinorelbina.

La composición farmacéutica (por ejemplo, forma unitaria) puede contener además uno o más anticuerpos monoclonales terapéuticos para tratar el cáncer. En realizaciones preferidas, el anticuerpo monoclonal terapéutico es bevacizumab, cetuximab, rituximab, trastuzumab o una combinación de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es un esquema del fragmento variable de cadena sencilla del anticuerpo 3E10 (3E10 scFv) compuesto por las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de 3E10 unidas por un dominio de enlace (LD). Se agregaron etiquetas Myc e His6 para permitir la detección y purificación. El 3E10 scFv penetra en los núcleos de las células cancerosas (demostrado con células de cáncer de ovario Skov-3 tratadas con 3E10 scFv 5 μ M durante 30 minutos, y después fijadas y teñidas con un anticuerpo anti-Myc). La Figura 1B es un gráfico de barras que muestra la supervivencia clonogénica (fracción de supervivientes en relación con el control) de células de glioma humano U251 irradiadas a 0 Gy (barras 1-2) o 4 Gy (barras 3-4) en presencia de tampón de control (barras 1 y 3) o 10 μ M 3E10 Fv (barras 2 y 4). Las barras de error representan el error estándar para experimentos replicados. Las Figuras 1C-1D son gráficos que muestran la muerte celular (% medido por fluorescencia de yoduro de propidio) de células de glioma humano U87 en función de doxorubicina (Dox) (0-250 nM) (Fig. 1E) o paclitaxel (0-2,5 nM) (Fig. 1F) en presencia (línea discontinua) o ausencia (línea continua) de 3E10 scFv 10 μ M.

La Figura 2A demuestra las diferentes conformaciones de sustratos de ADN utilizados en experimentos de unión de 3E10-ADN. La Figura 2B es un gráfico que muestra la fracción (%) de oligonucleótidos radiomarcados con (línea continua) o sin (línea discontinua) cola de cadena sencilla libre unida por 3E10 (determinado por análisis de desplazamiento de movilidad de gel) después de la incubación con concentraciones crecientes de 3E10 (0- 1 μ M). Estas curvas de unión producen K_{ds} de 0,2 μ M y 0,4 μ M para la unión de 3E10 a sustratos con y sin un extremo de cadena sencilla libre, respectivamente. Las Figuras 2C-2H presentan curvas de unión de 3E10-ADN individuales para cada conformación de ADN. La Figura 2I es un gráfico de barras que muestra la reparación de la rotura de cadena sencilla/escisión de bases (BER) (% $n + 1$ productos representan la proporción de intermedios reparados de forma incompleta en los que se ha agregado un nucleótido a una molécula dúplex separada aunque la rotura de la cadena sencilla restante no se ha reparado para producir un producto completo) en sustratos de ADN dúplex radiomarcados sintéticos incubados con las enzimas de reparación necesarias en presencia de tampón de control (barras en blanco) o 3E10 20 μ M (barras rellenas). La reacción de reparación se detuvo en los puntos de tiempo indicados, y los productos de reacción n , $n + 1$ y dúplex se cuantificaron por electroforesis en gel y autorradiografía.

La Figura 3A es un esquema de un ensayo de intercambio de cadena de ADN *in vitro*. Las Figuras 3B y 3C son gráficos de barras que muestran el impacto del aumento de la dosis de 3E10 (0-35 μ M) en el intercambio de cadena mediado por RAD51 utilizando la proteína hRAD51 de tipo silvestre (Fig. 3B) o la variante, hRAD51K133R (Fig. 3C). La variante hRAD51K133R es aún más activa para el intercambio de cadena que la proteína de tipo silvestre porque no hidroliza el ATP. 3E10 inhibe el intercambio de cadena tanto por RAD51 de tipo silvestre como por la variante hRAD51K133R. Las imágenes de inmunofluorescencia demuestran roturas de la doble cadena de ADN (focos γ H2AX) por célula de glioma U251 24 horas después de la irradiación con 2 Gy en presencia de tampón de control o 3E10 scFv 10 μ M. La Figura 3D es un gráfico de barras que muestra el número promedio de roturas de la doble cadena de ADN (focos γ H2AX) por célula de glioma U251 24 horas después de la irradiación con 2 Gy en presencia de tampón de control (barra en blanco) o 3E10 scFv 10 μ M (barra rellena). Las barras de error representan errores estándar.

Las Figuras 4A-4B son gráficos de barras que muestran la supervivencia clonogénica (fracción de supervivientes en relación con el control) de células de cáncer de ovario humano con actividad BRCA2 (Fig. 4A) o sin actividad BRCA2 (Fig. 4B) tratadas con tampón de control (barras en blanco) o 3E10 scFv 10 μ M (barras rellenas) por formación de colonias medida 1-2 semanas después del tratamiento. La Figura 4C es un gráfico que muestra el % de muerte celular de células de cáncer de ovario humano sin actividad BRCA2 (PEO1) y con actividad BRCA2 (PEO4) tratadas con 3E10 scFv (0-2 μ M). El impacto de 3E10 scFv en la supervivencia celular se evaluó tres días después del tratamiento con la luminiscencia CellTiterGlo®, que da los niveles de ATP como una medida de células metabólicamente activas. Las barras de error representan el error estándar de la media de seis mediciones. La Figura 4D es un gráfico que muestra la supervivencia clonogénica (fracción de supervivencia en relación con el control medido por la formación de colonias) de células CAPAN1/neo (células de cáncer pancreático humano) sin actividad BRCA2 tratadas con tampón de control o 3E10 scFv. La Figura 4E es un gráfico que muestra la muerte celular (%) de células de cáncer de ovario humano sin actividad BRCA2 (línea discontinua) o con actividad BRCA2 (línea continua) tratadas con 0 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M o 10 μ M del anticuerpo 3E10 completo. Las Figuras 4F y 4G son gráficos de barras que muestran la muerte celular (%) de células de cáncer de ovario humano sin actividad BRCA2 (Fig. 4G) o con actividad BRCA2 (Fig. 4F) tratadas con tampón de control (barra 1), 3E10 10 μ M (barra 2), doxorubicina (Dox) 3 nM (barra 3) o 3E10 10 μ M + doxorubicina 3 nM (barra 4).

La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra el volumen tumoral (% de aumento) de tumores de glioma U87 generados en ratones SCID por inyección subcutánea tratados con por inyección intraperitoneal de tampón de control (barra 1), anticuerpo 3E10 solo (0,8 mg en 0,5 ml de PBS, 10 μ M) (barra 2), doxorubicina (Dox) solo (80 μ g/kg) (barra 3), o tanto 3E10 como doxorubicina (barra 4). Cada grupo de tratamiento estaba compuesto por 4 ratones. El impacto del tratamiento se evaluó midiendo el crecimiento tumoral tres días después de la inyección.

La Figura 6A es un gráfico que muestra el volumen tumoral (mm^3) en función del tiempo (días) de ratones con xenoinjerto de glioma humano tratados con inyección intraperitoneal de tampón PBS de control (diamantes y triángulos sólidos) o 3E10 (1 mg en PBS) (rombos y triángulos en blanco) veintiséis días después de la implantación de células U87 (los tumores habían crecido hasta un tamaño medio de aproximadamente 100 mm^3), nuevamente 24 horas después, y después irradiados con 0 Gy (rombos) u 8 Gy (triángulos) 2 horas

después de la segunda inyección.

La Figura 6B presenta gráficas de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de progresión en cada grupo. La supervivencia libre de progresión se define como la supervivencia con tumor que no ha aumentado su tamaño en tres veces o más en relación con el tamaño basal. El tamaño basal se define como el tamaño del tumor un día antes del tratamiento con anticuerpos, que se representa como el día 25 en la Figura 6A y el día 0 en la Figura 6B. El tiempo de triplicación tumoral (tiempo requerido para que los tumores aumenten el volumen tres veces respecto al valor basal) fue de $9,5 \pm 0,5$ días en tumores tratados con 8 Gy en comparación con $13,7 \pm 1,8$ días en tumores tratados con 8 Gy + 3E10 ($p = 0,04$). Sin embargo, 3E10 solo, no tuvo impacto en los tumores U87 en relación con el tampón de control solo, con un tiempo de triplicación tumoral de los tumores de control $6,8 \pm 0,7$ días frente a $6,5 \pm 0,3$ días en tumores tratados con 3E10 solo ($p = 0,67$)

Descripción detallada de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualquier otro aspecto o realización expuestos en este documento que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones es solo a título informativo.

I. Definiciones

El término “anticuerpo” se refiere a anticuerpos naturales o sintéticos que se unen selectivamente a un antígeno diana. El término incluye anticuerpos policlonales y monoclonales. Además de las moléculas de inmunoglobulina intactas, también se incluyen en el término “anticuerpos” fragmentos o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina, y versiones humanas o humanizadas de moléculas de inmunoglobulina que se unen selectivamente al antígeno diana.

La expresión “anticuerpo anti-ADN que penetra en las células” se refiere a un anticuerpo que se transporta al núcleo de las células de mamíferos vivos y se une específicamente al ADN (por ejemplo, ADN de cadena sencilla y/o de doble cadena). En realizaciones preferidas, el anticuerpo se transporta al núcleo de las células sin la ayuda de un vehículo o conjugado. En otras realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un resto que penetra en las células, tal como un péptido que penetra en las células.

La expresión “se une específicamente” se refiere a la unión de un anticuerpo a su antígeno afín (por ejemplo, ADN) mientras que no se une significativamente a otros antígenos. Preferiblemente, un anticuerpo “se une específicamente” a un antígeno con una constante de afinidad (K_a) mayor que aproximadamente 10^5 mol^{-1} (p.ej., 10^6 mol^{-1} , 10^7 mol^{-1} , 10^8 mol^{-1} , 10^9 mol^{-1} , 10^{10} mol^{-1} , 10^{11} mol^{-1} , y 10^{12} mol^{-1} o más con esa segunda molécula.

La expresión “anticuerpo monoclonal” o “MAB” se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales dentro de la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en un pequeño subconjunto de las moléculas de anticuerpo.

La expresión “reparación de ADN” se refiere al conjunto de procesos mediante los cuales una célula identifica y corrige el daño a las moléculas de ADN. Los defectos de cadena sencilla se reparan mediante la reparación por escisión de bases (BER), la reparación por escisión de nucleótidos (NER) o la reparación de desapareamiento (MMR). Las roturas de doble cadena se reparan mediante una unión final no homóloga (NHEJ), una unión final mediada por microhomología (MMEJ) o una recombinación homóloga. Después del daño en el ADN, se activan los puntos de control del ciclo celular, que detienen el ciclo celular para darle tiempo a la célula para reparar el daño antes de continuar dividiéndose. Las proteínas mediadoras del punto de control incluyen BRCA1, MDC1, 53BP1, p53, ATM, ATR, CHK1, CHK2 y p21.

La expresión “reparación defectuosa del ADN” se refiere a un estado en el que una célula mutada o una célula con expresión génica alterada es incapaz de reparar el ADN o tiene una actividad reducida de una o más vías de reparación del ADN o tarda más en reparar el daño a su ADN en comparación con una célula de tipo silvestre.

La expresión “quimiosensibilidad” se refiere a la susceptibilidad relativa de las células cancerosas a los efectos de los fármacos contra el cáncer. Cuanto más quimiosensible es una célula cancerosa, menos fármaco contra el cáncer se requiere para destruir esa célula.

El término “radiosensibilidad” se refiere a la susceptibilidad relativa de las células al efecto nocivo de la radiación ionizante. Cuanto más radiosensible es una célula, menos radiación se requiere para destruir esa célula. En general, se ha encontrado que la radiosensibilidad celular es directamente proporcional a la tasa de división celular e inversamente proporcional a la capacidad de la célula para reparar el ADN.

El término “rادیورresistente” se refiere a una célula que no muere cuando se expone a dosis clínicamente adecuadas de radiación.

La expresión “célula neoplásica” se refiere a una célula que experimenta una proliferación celular anormal

(“neoplasia”). El crecimiento de las células neoplásicas excede y no está coordinado con el de los tejidos normales circundantes. El crecimiento generalmente persiste de la misma manera excesiva incluso después del cese de los estímulos, y normalmente causa la formación de un tumor.

- 5 El término “tumor” o “neoplasia” se refiere a una masa anormal de tejido que contiene células neoplásicas. Las neoplasias y los tumores pueden ser benignos, premalignos o malignos.

El término “cáncer” o la expresión “neoplasia maligna” se refiere a una célula que muestra un crecimiento descontrolado, invasión de tejidos adyacentes y, a menudo, metástasis a otras localizaciones del cuerpo.

- 10 El término “antineoplásico” se refiere a una composición, como un fármaco o un producto biológico, que puede inhibir o prevenir el crecimiento, la invasión y/o la metástasis del cáncer.

- 15 La expresión “resto anticanceroso” se refiere a cualquier agente, como un péptido, proteína, ácido nucleico o molécula pequeña, que puede combinarse con los anticuerpos anti-ADN divulgados para mejorar las propiedades anticancerosas de los anticuerpos. El término incluye fármacos antineoplásicos, anticuerpos que se unen e inhiben otros objetivos terapéuticos en las células cancerosas, y sustancias que tienen afinidad por las células cancerosas para el direccionamiento dirigido de las células cancerosas.

- 20 La expresión “célula transformada viralmente” se refiere a una célula que ha sido infectada con un virus o que ha incorporado ADN o ARN viral en su genoma. El virus puede ser un virus oncogénico de transformación aguda o de transformación lenta. En los virus de transformación aguda, las partículas virales llevan un gen que codifica un oncogén hiperactivo llamado oncogen viral (*v-onc*), y la célula infectada se transforma tan pronto como se expresa el *v-onc*. Por el contrario, en los virus de transformación lenta, el genoma del virus se inserta cerca de un protooncogen en el genoma del hospedador. Los ejemplos de oncovirus incluyen los virus del papiloma humano (VPH), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC), el virus linfotrópico de linfocitos T humanos (HTLV), el virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (VHH-8), el poliomavirus de células de Merkel, el virus de Epstein-Barr (EBV), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el citomegalovirus (CMV) humano.

- 30 Una célula infectada por virus se refiere a una célula que ha sido expuesta o infectada con un virus o que porta material genético viral, ya sea ARN o ADN. El virus puede ser un virus oncogénico o un virus lítico o un virus latente y puede causar cáncer, inmunodeficiencia, hepatitis, encefalitis, neumonitis, enfermedad respiratoria u otra enfermedad. Anteriormente se ha demostrado que los retrovirus, específicamente el VIH, dependen en parte de la vía de reparación por escisión de bases (BER) para la integración en el ADN del hospedador. La capacidad de 3E10 para inhibir la reparación del ADN proporciona un mecanismo mediante el cual 3E10 y otros anticuerpos anti-ADN pueden mejorar enfermedades causadas por virus, en particular, al interferir con la reparación del ADN y, por lo tanto, al bloquear el metabolismo del ADN o ARN que forma parte de los ciclos de vida del virus, así como parte de la infección viral de una célula. Los ejemplos demuestran que 3E10 inhibe la vía BER, lo que respalda la eficacia en la supresión de la infectividad de tales retrovirus.

- 40 El término “individuo”, “anfitrión”, “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente para referirse a cualquier individuo que es el objetivo de la administración o el tratamiento. El sujeto puede ser un vertebrado, por ejemplo, un mamífero. Por lo tanto, el sujeto puede ser un paciente humano o veterinario.

- 45 La expresión “terapéuticamente efectiva” significa que la cantidad de la composición utilizada es de cantidad suficiente para mejorar una o más causas o síntomas de una enfermedad o trastorno. Dicha mejora solo requiere una reducción o alteración, no necesariamente una eliminación. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición para tratar el cáncer es preferiblemente una cantidad suficiente para causar la regresión tumoral o sensibilizar un tumor a la radiación o quimioterapia.

- 50 La expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a un material que no es biológicamente o de otra manera indeseable, es decir, el material puede administrarse a un sujeto sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido. El vehículo se seleccionaría naturalmente para minimizar cualquier degradación del principio activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como sería bien sabido por un experto en la materia.

- 60 El término “tratamiento” se refiere al manejo médico de un paciente con la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, afección patológica o trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente a la mejora de una enfermedad, afección patológica o trastorno, y también incluye el tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido a la eliminación de la causa de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociado.

- 65 Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas en lugar de la curación de la enfermedad, afección o patológico o trastorno; tratamiento preventivo, es decir, tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, afección o trastorno patológico asociado; y tratamiento de apoyo, es decir, tratamiento empleado para complementar otra

terapia específica dirigida hacia la mejora de la enfermedad, afección o trastorno patológico asociado.

El término "inhibir" significa disminuir una actividad, respuesta, afección, enfermedad u otro parámetro biológico. Esto puede incluir, entre otros, la ablación completa de la actividad, respuesta, afección o enfermedad. Esto también puede incluir, por ejemplo, una reducción del 10 % en la actividad, respuesta, condición o enfermedad en comparación con el nivel nativo o de control. Por lo tanto, la reducción puede ser un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 %, o cualquier cantidad de reducción intermedia en comparación con los niveles nativos o de control.

Una "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido formado por la unión de dos o más polipéptidos a través de un enlace peptídico formado entre el extremo amino de un polipéptido y el extremo carboxilo de otro polipéptido. La proteína de fusión puede formarse mediante el acoplamiento químico de los polipéptidos constituyentes o puede expresarse como un polipéptido único a partir de una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión contigua única. Una proteína de fusión de cadena sencilla es una proteína de fusión que tiene un esqueleto de polipéptido contiguo único. Las proteínas de fusión se pueden preparar utilizando técnicas convencionales en biología molecular para unir los dos genes en el marco en una única secuencia de ácido nucleico, y luego expresar el ácido nucleico en una célula hospedadora apropiada en condiciones en las que se produce la proteína de fusión.

II. Composiciones

A. Anticuerpos anti-ADN

Los anticuerpos anti-ADN que penetran en la célula se divulgan para su uso en la mejora de la sensibilidad de las células diana a la quimioterapia y/o radiación. Los autoanticuerpos contra el ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadena sencilla o de doble cadena se identifican con frecuencia en el suero de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y a menudo están implicados en la patogénesis de la enfermedad. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los anticuerpos anti-ADN pueden derivarse o aislarse de pacientes con LES. Los anticuerpos anti-ADN son anticuerpos monoclonales, o fragmentos o variantes de los mismos. La presencia de autoanticuerpos circulantes reactivos contra el ADN (anticuerpos anti-ADN) es un hallazgo de laboratorio característico en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). Aunque el papel preciso de los anticuerpos anti-ADN en el LES no está claro, se ha sugerido que los anticuerpos juegan un papel activo en la fisiopatología del LES. A principios de la década de los 90, se probó un anticuerpo anti-ADN de lupus murino, 3E10, en terapia de vacuna experimental para el LES. Estos esfuerzos tenían como objetivo desarrollar anticuerpos anti-idiotipo que se unieran específicamente a los anticuerpos anti-ADN en pacientes con LES. Sin embargo, se encontró por casualidad que 3E10 penetraba en las células y núcleos vivos sin causar ninguna citotoxicidad observada (Weisbart RH, et al. J Immunol. 1990 144 (7): 2653-2658; Zack DJ, et al. J Immunol. 1996 157 (5): 2082-2088). Los estudios sobre 3E10 en la terapia de vacuna SLE fueron suplantados por esfuerzos enfocados en el desarrollo de 3E10 como un vehículo de administración molecular para el transporte de moléculas terapéuticas a células y núcleos. También se describieron otros anticuerpos que penetraban en las células.

El anticuerpo 3E10 y su fragmento variable de cadena sencilla (3E10 scFv) penetran en las células y los núcleos y han demostrado ser capaces de transportar cargas de proteínas terapéuticas unidas al anticuerpo mediante conjugación química o fusión recombinante. Las cargas de proteínas suministradas a las células por 3E10 o 3E10 scFv incluyen catalasa, p53 y Hsp70 (Weisbart RH, et al. J Immunol. 2000 164: 6020-6026; Hansen JE et al. Cancer Res. 15 de febrero de 2007; 67(4):1769-74; Hansen JE et al. Brain Res. 9 de mayo de 2006; 1088(1):187-96). 3E10 scFv medió efectivamente en la administración de Hsp70 a las neuronas *in vivo* y esto tuvo como resultado la disminución de los volúmenes de infarto cerebral y una mejor función neurológica en un modelo de accidente cerebrovascular de rata (Zhan X, et al. Stroke. 2010 41(3): 538-43).

Ahora se ha descubierto que 3E10 y 3E10 scFv, sin conjugarse con ninguna proteína terapéutica, aumentan la radiosensibilidad y la quimiosensibilidad de las células cancerosas y que este efecto se potencia en células con reparación defectuosa del ADN. Además, 3E10 y 3E10 scFv son selectivamente letales para las células cancerosas con reparación defectuosa del ADN incluso en ausencia de radiación o quimioterapia. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha establecido una vía para el desarrollo de anticuerpos monoclonales en terapias humanas, y 3E10 ya ha sido aprobado por la FDA para su uso en un ensayo clínico humano de Fase I diseñado para probar la eficacia de 3E10 en un terapia con una vacuna experimental para el LES (Spertini F, et al. J Rheumatol. 1999 26(12): 2602-8). Por lo tanto, estos tipos de anticuerpos pueden usarse para terapia dirigida para los cánceres con reparación defectuosa del ADN, así como en nuevas terapias dirigidas para el cáncer para potenciar otras modalidades de tratamiento de cáncer en cánceres con actividad normal de reparación de ADN, así como en cánceres sin actividad de reparación del ADN.

En realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-ADN se transporta al núcleo de las células sin la ayuda de un vehículo conjugado.

El anticuerpo monoclonal 3E10 y fragmentos activos del mismo que son transportados *in vivo* al núcleo de las células de mamífero se divulgan en las patentes US-4.812.397 y US-7.189.396, concedida Richard Weisbart, que describe los anticuerpos 3E10 y los métodos para producir y modificar los anticuerpos 3E10. Brevemente, los

anticuerpos pueden prepararse fusionando células del bazo de un hospedador que tiene niveles séricos elevados de anticuerpos anti-ADN (por ejemplo, ratones MRL/1pr) con células de mieloma de acuerdo con técnicas conocidas o transformando las células del bazo con un vector de transformación apropiado para inmortalizar las células. Las células pueden cultivarse en un medio selectivo y seleccionarse para seleccionar anticuerpos que se unen al ADN.

5 Los anticuerpos que pueden usarse incluyen inmunoglobulina completa (es decir, un anticuerpo intacto) de cualquier clase, fragmentos de la misma y proteínas sintéticas que contienen al menos el dominio variable de unión a antígeno de un anticuerpo. Los dominios variables difieren en la secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no suele distribuirse uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Normalmente se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, adoptando en gran medida una configuración de hoja beta, conectada por tres CDR, que forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de hoja beta. 10 Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Por lo tanto, los anticuerpos contienen al menos los componentes de las CDR necesarios para penetrar en las células, mantener la unión del ADN y/o interferir con la reparación del ADN. La región variable de 3E10 contiene las tres propiedades.

15 También se divulgan fragmentos de anticuerpos que tienen bioactividad. Los fragmentos, unidos o no a otras secuencias, incluyen inserciones, deleciones, sustituciones u otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o restos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad del fragmento no se altere o altere significativamente en comparación con el anticuerpo no modificado o fragmento de anticuerpo.

20 Las técnicas también se pueden adaptar para la producción de anticuerpos de cadena sencilla específicos para una proteína antigénica. Los expertos en la materia conocen bien los métodos para la producción de anticuerpos de cadena sencilla. Se puede crear un anticuerpo de cadena sencilla fusionando los dominios variables de las cadenas pesada y ligera usando un conector peptídico corto, reconstituyendo así un sitio de unión al antígeno en una molécula única. Se han desarrollado fragmentos variables de anticuerpos de cadena sencilla (scFvs) en los que el extremo C de un dominio variable está unido al extremo N del otro dominio variable a través de un péptido o conector de 15 a 25 aminoácidos sin alterar significativamente la unión al antígeno o especificidad de la unión. El enlazador se elige para permitir que la cadena pesada y la cadena ligera se unan en su orientación conformacional adecuada.

25 Los anticuerpos anti-ADN pueden modificarse para mejorar su potencial terapéutico.

30 Los fragmentos variables de cadena única divalentes (di-scFvs) se pueden diseñar uniendo dos scFvs. Esto se puede hacer produciendo una sola cadena peptídica con dos regiones VH y dos regiones VL, produciendo scFvs en tándem. Los ScFvs también se pueden diseñar con péptidos enlazadores que son demasiado cortos para que las dos regiones variables se plieguen (aproximadamente cinco aminoácidos), lo que obliga a los scFvs a dimerizarse. Este tipo se conoce como diacuerpos. Se ha demostrado que los diacuerpos tienen constantes de disociación de hasta 40 veces más bajas que los scFv correspondientes, lo que significa que tienen una afinidad mucho mayor con su diana. Los enlazadores aún más cortos (uno o dos aminoácidos) conducen a la formación de trímeros (triacuerpos o tribodies). También se han producido tetracuerpos. Éstos exhiben una afinidad aún mayor por sus dianas que los diabodies.

35 Una proteína de fusión recombinante es una proteína creada mediante ingeniería genética de un gen de fusión. Esto generalmente implica eliminar el codón de parada de una secuencia de ADNc que codifica la primera proteína, y luego agregar la secuencia de ADNc de la segunda proteína en el marco mediante ligadura o PCR por superposición de extensión. La secuencia de ADN será expresada por una célula como una proteína única. La proteína puede ser diseñada para incluir la secuencia completa de ambas proteínas originales, o solo una porción de cualquiera de ellas. Si las dos entidades son proteínas, también se suelen agregar péptidos enlazadores (o "espaciadores") que hacen que sea más probable que las proteínas se plieguen independientemente y se comporten como se esperaba.

40 Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos "importados", que normalmente se toman de un dominio variable "importado". Las técnicas de humanización de anticuerpos generalmente implican el uso de tecnología de ADN recombinante para manipular la secuencia de ADN que codifica una o más cadenas de polipéptidos de una molécula de anticuerpo.

45 En algunas realizaciones, el anticuerpo que penetra en las células se modifica para alterar su semivida. En algunas realizaciones, es deseable aumentar la semivida del anticuerpo para que esté presente en la circulación o en el sitio de tratamiento durante períodos de tiempo más largos. Por ejemplo, cuando los anticuerpos anti-ADN se usan solos para tratar el cáncer, por ejemplo, células cancerosas que tienen una reparación defectuosa del ADN, puede ser

deseable mantener títulos del anticuerpo en la reparación defectuosa del ADN, puede ser deseable mantener títulos del anticuerpo en la circulación o en el lugar a tratar durante largos períodos de tiempo. En otras realizaciones, la semivida del anticuerpo anti-ADN se reduce para reducir los posibles efectos secundarios. Por ejemplo, cuando el anticuerpo se usa junto con radioterapia o quimioterapia, el anticuerpo está presente preferiblemente en la circulación a dosis altas durante el tratamiento con radiación o fármaco antineoplásico, pero por lo demás se elimina rápidamente de la circulación. Se espera que los fragmentos de anticuerpos, como 3E10 scFv, tengan una semivida más corta que los anticuerpos de tamaño completo. Se conocen otros métodos para alterar la semivida y se pueden usar en los métodos descritos. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden diseñar con variantes Fc que prolongan la semivida, por ejemplo, usando la tecnología de prolongación de la semivida del anticuerpo Xtend™ (Xencor, Monrovia, CA).

B. Cánceres y células transformadas por virus

Los anticuerpos pueden usarse para tratar células que experimentan crecimiento, invasión o metástasis no reguladas. Las células cancerosas con reparación defectuosa del ADN son dianas particularmente buenas para los anticuerpos anti-ADN que penetran en las células. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-ADN que penetran en las células son letales para las células con reparación defectuosa del ADN. En realizaciones preferidas, las células son defectuosas en la expresión de un gen implicado en la reparación de ADN, síntesis de ADN o recombinación homóloga. Los ejemplos de genes incluyen *XRCC1*, *ADPRT* (*PARP-1*), *ADPRTL2*, (*PARP-2*), *POLYMERASE BETA*, *CTPS*, *MLH1*, *MSH2*, *FANCD2*, *PMS2*, p53, p21, *PTEN*, *RPA*, *RPA1*, *RPA2*, *RPA3*, *XPD*, *ERCC1*, *XPF*, *MMS19*, *RAD51*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *DMC1*, *XRCCR*, *XRCC3*, *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD50*, *MRE11*, *NBS1*, *WRN*, *BLM*, *KU70*, *KU80*, *ATM*, *ATR*, *CHK1*, *CHK2*, *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCC*, *FANCD1*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *RAD1*, y *RAD9*. En algunas realizaciones, el gen defectuoso es un gen supresor de tumores. En realizaciones preferidas, las células tienen una o más mutaciones en *BRCA1* o *BRCA2*. Las mutaciones génicas, como las mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*, pueden identificarse utilizando PCR estándar, hibridación o técnicas de secuenciación.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, los anticuerpos anti-ADN pueden usarse para tratar cánceres que surgen de síndromes familiares de reparación defectuosa del ADN, tales como los cánceres de mama, ovario y páncreas. En estas realizaciones, los anticuerpos anti-ADN pueden ser efectivos sin radioterapia o quimioterapia. Por ejemplo, los anticuerpos anti-ADN pueden usarse para tratar cánceres que están asociados con mutaciones en *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, o *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D* o genes relacionados. Los anticuerpos anti-ADN también se pueden usar para tratar cánceres de colon, tumores endometriales o tumores cerebrales relacionados con mutaciones en genes asociados con la reparación de mal apareamiento de ADN, como *MSH2*, *MLH1*, *PMS2*, y genes relacionados. Los anticuerpos anti-ADN también se pueden usar para tratar cánceres con genes de reparación de ADN silenciados, como *BRCA1*, *MLH1*, *OR RAD51B*, *RAD51C*, o *RAD51D*. En estas realizaciones preferidas, la capacidad de los anticuerpos anti-ADN para inhibir la reparación del ADN combinada con las deficiencias de reparación inherentes de estos cánceres puede ser suficiente para inducir la muerte celular.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, los anticuerpos anti-ADN pueden usarse para tratar células transformadas por virus, tales como células infectadas con un oncovirus. La transformación viral puede imponer cambios fenotípicos en la célula, como alta densidad de saturación, crecimiento independiente del anclaje, pérdida de inhibición de contacto, pérdida de crecimiento orientado, inmortalización e interrupción del citoesqueleto de la célula. Se requiere la persistencia de al menos parte del genoma viral dentro de la célula para la transformación celular. Esto puede estar acompañado por la expresión continua de una serie de genes virales, como los oncogenes. Estos genes pueden interferir con la vía de señalización de una célula causando los cambios fenotípicos observados en la célula. En algunos casos, el genoma viral se inserta cerca de un protooncogen en el genoma del hospedador. El resultado final es una célula transformada que muestra una mayor división celular, lo que es favorable para el virus. En algunas realizaciones, la transformación viral, la infección viral y/o el metabolismo dependen de los mecanismos de reparación del ADN. En estas realizaciones, la inhibición de la reparación del ADN usando los anticuerpos anti-ADN divulgados también inhibe la transformación viral, la infección viral y/o el metabolismo en la célula.

En algunas realizaciones, la transformación viral, la infección viral y/o el metabolismo dependen del metabolismo del ARN o ADN codificado viralmente como parte del ciclo de vida del virus, produciendo intermedios sujetos a la unión y/o inhibición por 3E10 u otro anticuerpo anti-ADN. En estas realizaciones, el tratamiento con los anticuerpos anti-ADN divulgados también inhibe la transformación viral, la infección viral y/o el metabolismo en la célula.

Con anterioridad se había descubierto que los lentivirus (como el VIH) dependen de la actividad BER del hospedador para la infección y la integración (Yoder et al., PLoS One, 6 de marzo de 2011(3) e17862) Además, la respuesta al daño del ADN con ataxia-telangiectasia mutada (ATM) parece ser crítica para la replicación del VIH (Lau et al., Nat Cell Biol, 2005 7(5): 493-500). En algunas realizaciones, la infección e integración retrovirales (incluyendo lentivirus, VIH) depende de los mecanismos de reparación del ADN del hospedador. En estas realizaciones, el tratamiento con los anticuerpos anti-ADN divulgados también suprime la infección/integración viral y suprime la reinfección en el ciclo de vida viral.

En algunas realizaciones, la replicación lentiviral (VIH) depende de la reparación del ADN. En estas realizaciones, el tratamiento con los anticuerpos anti-ADN divulgados también suprime la replicación viral y suprime la reinfección en el ciclo de vida viral. Por lo tanto, los anticuerpos anti-ADN pueden usarse para tratar células infectadas con un virus, como un oncovirus. En algunas realizaciones, los anticuerpos inhiben la transformación viral, la replicación, el metabolismo o una combinación de los mismos. Los ejemplos de oncovirus que pueden verse afectados por los anticuerpos anti-ADN incluyen los virus del papiloma humano (VPH), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC), el virus linfotrópico de linfocitos T humanos (HTLV), el virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi (VHH-8), el poliomavirus de células de Merkel, el virus de Epstein-Barr (EBV), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el citomegalovirus (CMV) humano. Los anticuerpos anti-ADN también pueden usarse para tratar un virus latente. En algunas realizaciones, la imposibilidad de las células infectadas para montar una respuesta frente al daño del ADN a los virus, tales como HSV-1, contribuye al establecimiento de la latencia. Por lo tanto, estas células infectadas por virus tienen una reparación defectuosa del ADN y son susceptibles de tratamiento con anticuerpos anti-ADN. Los ejemplos de virus latentes incluyen CMV, EBV, virus del herpes simple (tipo 1 y 2) y el virus varicela zoster.

Los anticuerpos anti-ADN también se pueden usar para tratar infecciones virales activas debido a virus que dan lugar a cáncer, inmunodeficiencia, hepatitis, encefalitis, neumonitis, enfermedad respiratoria u otra afección, en virtud de la capacidad de los anticuerpos para unirse al ADN e interferir con la reparación del ADN o el metabolismo del ARN que forma parte del ciclo de vida del virus.

Los virus representativos cuyo ciclo de vida o síntomas de la infección resultante, que pueden verse afectados por la administración de los anticuerpos incluyen los virus del papiloma humano (VPH), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC), el virus linfotrópico de linfocitos T humanos (HTLV), el herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (HHV-8), el poliomavirus de células de Merkel, el virus de Epstein-Barr (EBV), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el citomegalovirus (CMV) humano.

Otros virus que pueden verse afectados por la administración de los anticuerpos incluyen parvovirus, poxvirus, herpes virus y otros virus de ADN:

Familia de virus	Ejemplos (nombres comunes)	Virión desnudo/ envuelto	Simetría de la cápside	Tipo de ácido nucleico	Grupo
1. Adenoviridae	Adenovirus, virus de la hepatitis canina infecciosa	Desnudo	Icosaédrica	dc	I
2. Papillomaviridae	Virus del papiloma	Desnudo	Icosaédrica	dc circular	I
3. Parvoviridae	Parvovirus B19, parvovirus canino	Desnudo	Icosaédrica	cs	II
4. Herpesviridae	Virus herpes simple, virus varicela-zoster, citomegalovirus, virus Epstein-Barr	Envuelto	Icosaédrica	dc	I
5. Poxviridae	Virus de la viruela, virus de la viruela de las vacas, virus de la viruela de las ovejas, virus orf, virus de la viruela del mono, virus vaccinia	Cubiertas complejas	Compleja	dc	I
6. Hepadnaviridae	Virus de la hepatitis B	Envuelto	Icosaédrica	circular, parcialmente dc	VII
7. Polyomaviridae	Virus de polioma; Virus JC (leucoencefalopatía multifocal progresiva)	Desnudo	Icosaédrica	dc circular	I
8. Anelloviridae	Torque teno virus	Desnudo	Icosaédrica	dc circular	I

Los virus de ARN que pueden verse afectados por la administración de los anticuerpos incluyen:

Familia de virus	Ejemplos (nombres comunes)	Cápside desnuda/ envuelta	Simetría de la cápside	Tipo de ácido nucleico	Grupo
1. Reoviridae	Reovirus, Rotavirus	Desnuda	Icosaédrica	dc	III
2. Picornaviridae	Enterovirus, Rhinovirus, Hepatovirus, Cardiovirus, Aphthovirus, Poliovirus, Parechovirus, Erbovirus, Kobuvirus, Teschovirus, Coxsackie	Desnuda	Icosaédrica	cs	IV
3. Caliciviridae	Virus Norwalk	Desnuda	Icosaédrica	cs	IV
4. Togaviridae	Virus de la rubéola	Envuelta	Icosaédrica	cs	IV
5. Arenaviridae	Virus de la coriomeningitis linfocítica	Envuelta	Compleja	cs (-)	V
6. Flaviviridae	Virus del dengue, virus de la hepatitis C, virus de la fiebre amarilla	Envuelta	Icosaédrica	cs	IV
7. Orthomyxoviridae	Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C, Isavirus, Thogotovirus	Envuelta	Helicoidal	cs (-)	V
8. Paramyxoviridae	Virus del sarampión, virus de las paperas, virus sincitial respiratorio, virus de la peste bovina, virus del moquillo canino	Envuelta	Helicoidal	cs (-)	V
9. Bunyaviridae	Virus de la encefalitis de California, Hantavirus	Envuelta	Helicoidal	cs (-)	V
10. Rhabdoviridae	Virus de la rabia	Envuelta	Helicoidal	cs (-)	V
11. Filoviridae	Virus del Ébola, virus de Marburg	Envuelta	Helicoidal	cs (-)	V
12. Coronaviridae	Virus corona	Envuelta	Helicoidal	cs	IV
13. Astroviridae	Astrovirus	Desnuda	Icosaédrica	cs	IV
14. Bomaviridae	Virus de la enfermedad de Borna	Envuelta	Helicoidal	cs (-)	V
15. Arteriviridae	Arterivirus, virus de la arteritis equina	Envuelta	Icosaédrica	cs	IV
16. Hepeviridae	Virus de la hepatitis E	Desnuda	Icosaédrica	cs	IV

Los retrovirus también pueden verse afectados:

- 5.
 - género *Alpharetrovirus*; especie tipo: Virus de la leucosis aviar; otros incluyen Virus del sarcoma de Rous
 - género *Betaretrovirus*; especie tipo: Virus de tumor mamario de ratón
 - género *Gammaretrovirus*; especie tipo: Virus de la leucemia murina; otros incluyen Virus de la leucemia felina
 - género *Deltaretrovirus*; especie tipo: Virus de la leucemia bovina; otros incluyen el Virus linfotrópico de linfocitos T humanos asociado a cáncer

- género *Epsilonretrovirus*; especie tipo: Virus del sarcoma dérmico de Walleye
- género *Lentivirus*; especie tipo: Virus de la inmunodeficiencia humana 1; otros incluyen virus de inmunodeficiencia de los simios, virus de la inmunodeficiencia felina
- género *Spumavirus*; especie tipo: Virus espumoso de los simios
- 5 ▪ familia *Hepadnaviridae* - p.ej. Virus de la hepatitis B

Otras enfermedades víricas que pueden verse afectadas por la administración de los anticuerpos incluyen la fiebre por garrapatas de Colorado (causada por coltivirus, virus de ARN), la fiebre del Nilo occidental (encefalitis, causada por un flavivirus que habita principalmente en el Medio Oriente y África), la fiebre amarilla, la rabia (causada por varias cepas diferentes de virus neurotrópicos de la familia *Rhabdoviridae*), la hepatitis vírica, gastroenteritis, gastroenteritis (vírica) aguda causada por el virus de Norwalk y virus similares al virus de Norwalk, rotavirus, calicivirus y astrovirus, poliomielitis, influenza (gripe) causada por ortomixovirus que pueden sufrir variaciones antigénicas frecuentes, sarampión (rubéola), *Paramyxoviridae*, paperas, síndromes respiratorios, incluida la neumonía viral y síndromes respiratorios agudos, incluido el crup causado por varios virus denominados colectivamente virus respiratorios agudos y enfermedades respiratorias causadas por el virus sincitial respiratorio (VSR, la causa más peligrosa de infección respiratoria en niños pequeños).

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-ADN pueden usarse en combinación con radioterapia, quimioterapia, o una combinación de las mismas, para tratar cualquier cáncer, incluidos carcinomas, gliomas, sarcomas o linfomas. En estas realizaciones, los anticuerpos anti-ADN pueden sensibilizar a las células a los efectos de la radioterapia o quimioterapia que dañan el ADN. Una lista representativa pero no limitante de cánceres para los que se pueden usar los anticuerpos como tratamiento incluye cánceres de la sangre y el sistema linfático (incluidas leucemias, linfomas de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, plasmacitoma solitario, mieloma múltiple), cánceres del sistema genitourinario (incluyendo cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer renal, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer testicular), cánceres del sistema nervioso (incluidos meningiomas, gliomas, glioblastomas, ependimomas), cánceres de cabeza y cuello (incluidos los carcinomas de células escamosas de la cavidad oral, cavidad nasal, cavidad nasofaríngea, cavidad orofaríngea, laringe y senos paranasales), cánceres de pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas), cánceres ginecológicos (incluyendo cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer vaginal, cáncer de vulva y ovario) y cáncer de trompas de Falopio), cánceres gastrointestinales (incluidos los cánceres gástrico, de intestino delgado, colorrectal, hepático, hepatobiliar y pancreático), cánceres de piel (incluyendo melanoma, carcinomas de células escamosas y carcinomas de células basales), cáncer de mama (incluyendo cáncer ductal y lobular) y cánceres pediátricos (incluyendo neuroblastoma, sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, meduloblastoma).

En algunas realizaciones, el cáncer es una neoplasia o tumor que demuestra cierta resistencia a la radioterapia o quimioterapia. Los cánceres que son resistentes a la radioterapia utilizando métodos estándar incluyen, entre otros, sarcomas, cáncer de células renales, melanoma, linfomas, leucemias, carcinomas, blastomas y tumores de células germinales.

40 C. Radioterapia

Los anticuerpos anti-ADN que penetran en las células descritos pueden usarse en combinación con radioterapia. La terapia con radiación (también conocida como radioterapia) es el uso médico de la radiación ionizante como parte del tratamiento del cáncer para controlar las células malignas. La radioterapia también tiene varias aplicaciones en afecciones no malignas, como el tratamiento de la neuralgia del trigémino, enfermedad ocular tiroidea grave, pterigión, sinovitis villonodular pigmentada, prevención del crecimiento de cicatrices queloides y prevención de la osificación heterotópica. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-ADN se usan para aumentar la radiosensibilidad para una afección no maligna.

La radioterapia funciona al dañar el ADN de las células en división, por ejemplo, las células cancerosas. Este daño en el ADN es causado por uno de los dos tipos de energía, fotones o partículas cargadas. Este daño es directo o indirecto. La ionización indirecta ocurre como resultado de la ionización del agua, formando radicales libres, especialmente radicales hidroxilo, que luego dañan el ADN. Por ejemplo, la mayor parte del efecto de la radiación causado por la terapia de fotones es a través de los radicales libres. Una de las principales limitaciones de la radioterapia con fotones es que las células de los tumores sólidos se vuelven deficientes en oxígeno, y las células tumorales en un entorno hipóxico pueden ser de 2 a 3 veces más resistentes al daño por radiación que las de un entorno de oxígeno normal.

El daño directo al ADN de las células cancerosas se produce a través de partículas cargadas de alta TEL (transferencia de energía lineal) como los iones protón, boro, carbono o neón. Este daño es independiente del suministro de oxígeno del tumor porque estas partículas actúan principalmente a través de la transferencia de energía directa que generalmente causa roturas de ADN de doble cadena. Debido a su masa relativamente grande, los protones y otras partículas cargadas tienen poca dispersión lateral en el tejido; el haz no se amplía mucho, permanece enfocado en la forma del tumor y produce pequeñas dosis de efectos secundarios en el tejido circundante. La cantidad de radiación utilizada en la radioterapia con fotones se mide en Gray (Gy) y varía según el tipo y el estadio del cáncer que se esté tratando. Para los casos curativos, la dosis típica para un tumor epitelial

sólido varía de 60 a 80 Gy, mientras que los linfomas se tratan con 20 a 40 Gy. Las dosis postoperatorias (adyuvantes) son normalmente de alrededor de 45 a 60 Gy en fracciones de 1,8 a 2 Gy (para los cánceres de mama, cabeza y cuello). Los oncólogos radioterápicos consideran muchos otros factores al seleccionar una dosis, incluso si el paciente está recibiendo quimioterapia, las comorbilidades del paciente, si la radioterapia se administra antes o después de la cirugía y el grado de éxito de la cirugía.

La respuesta de un cáncer a la radiación se describe por su radiosensibilidad. Las células cancerosas altamente radiosensibles son rápidamente destruidas por dosis moderadas de radiación. Estos incluyen leucemias, la mayoría de los linfomas y tumores de células germinales. La mayoría de los cánceres epiteliales son solo moderadamente radiosensibles y requieren una dosis de radiación significativamente más alta (60-70 Gy) para lograr una cura radical. Algunos tipos de cáncer son notablemente radorresistentes, es decir, se requieren dosis mucho más altas para producir una cura radical que lo que puede ser seguro en la práctica clínica. El cáncer de células renales y el melanoma generalmente se consideran radorresistentes.

La respuesta de un tumor a la radioterapia también está relacionada con su tamaño. Por razones complejas, los tumores muy grandes responden menos bien a la radiación que los tumores más pequeños o la enfermedad microscópica. Se utilizan varias estrategias para superar este efecto. La técnica más común es la resección quirúrgica previa a la radioterapia. Esto se observa con mayor frecuencia en el tratamiento del cáncer de mama con escisión local amplia o mastectomía seguida de radioterapia adyuvante. Otro método es reducir el tamaño del tumor con quimioterapia neoadyuvante antes de la radioterapia radical. Una tercera técnica es mejorar la radiosensibilidad del cáncer al administrar ciertos fármacos durante un ciclo de radioterapia. Los anticuerpos anti-ADN de penetración celular divulgados cumplen esta tercera función. En estas realizaciones, el anticuerpo anti-ADN aumenta la sensibilidad de la célula a la radioterapia, por ejemplo, al menos en un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %. Además, los anticuerpos anti-ADN que penetran en las células pueden combinarse con uno o más radiosensibilizadores adicionales. Los ejemplos de radiosensibilizadores conocidos incluyen cisplatino, gemcitabina, 5-fluorouracilo, pentoxifilina, vinorelbina, inhibidores de la PARP, inhibidores de la histona desacetilasa e inhibidores del proteasoma.

D. Quimioterápicos

Numerosos quimioterápicos, especialmente fármacos antineoplásicos, están disponibles para la combinación con los anticuerpos. La mayoría de los fármacos quimioterápicos se pueden dividir en agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, alcaloides vegetales, inhibidores de la topoisomerasa, anticuerpos monoclonales y otros agentes antitumorales.

En realizaciones preferidas, el fármaco antineoplásico daña el ADN o interfiere con la reparación del ADN ya que estas actividades se sinergizarán más eficazmente con el anticuerpo anti-ADN. En estas realizaciones, el anticuerpo aumenta la sensibilidad de la célula a la quimioterapia, por ejemplo, al menos en un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %. Entre los ejemplos no limitantes de fármacos antineoplásicos que dañan el ADN o inhiben la reparación del ADN se incluyen carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, mitoxantrona, oxaliplatino, procarbaza, temozolomida y valrubicina. En algunas realizaciones, el fármaco antineoplásico es la temozolomida, que es un agente alquilante que daña el ADN comúnmente usado contra los glioblastomas. En algunas realizaciones, el fármaco antineoplásico es un inhibidor de la PARP, que inhibe una etapa en la reparación por escisión de bases del daño en el ADN. En algunas realizaciones, el fármaco antineoplásico es un inhibidor de la histona desacetilasa, que suprime la reparación del ADN a nivel transcripcional y altera la estructura de la cromatina. En algunas realizaciones, el fármaco antineoplásico es un inhibidor del proteasoma, que suprime la reparación del ADN por la alteración del metabolismo de la ubiquitina en la célula. La ubiquitina es una molécula de señalización que regula la reparación del ADN. En algunas realizaciones, el fármaco antineoplásico es un inhibidor de la quinasa, que suprime la reparación del ADN al alterar las vías de señalización de la respuesta al daño del ADN.

En otras realizaciones, el fármaco antineoplásico complementa los anticuerpos anti-ADN dirigiéndose a una actividad diferente en la célula cancerosa. En estas realizaciones, el fármaco antineoplásico no inhibe la reparación del ADN ni daña el ADN.

Los ejemplos de fármacos antineoplásicos que se pueden combinar con los anticuerpos anti-ADN que penetran en las células incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes (como temozolomida, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo, dacarbazina, lomustina, carmustina, procarbaza, clorambucilo e ifosfamida), antimetabolitos (tales como fluorouracilo, gemcitabina, metotrexato, arabinósido de citosina, fludarabina, y floxuridina), algunos antimetabólicos, y alcaloides de la vinca tales como vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina), antraciclinas (incluyendo doxorubicina, daunorrubicina, valrubicina, idarrubicina y epirubicina, así como actinomicinas como la actinomicina D), antibióticos citotóxicos (incluyendo mitomicina, plicamicina y bleomicina) e inhibidores de la topoisomerasa (incluidas camptotecinas como irinotecán y topotecán y derivados de la epipodofilotoxinas, como amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido y tenipósido).

E. Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos anti-ADN que penetran en las células pueden usarse terapéuticamente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una dosis unitaria que contiene un anticuerpo anti-ADN o fragmento del mismo que penetra en las células en un excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que el anticuerpo está presente en una cantidad efectiva para inhibir la reparación del ADN en un cáncer o una célula infectada. En realizaciones preferidas, el anticuerpo está presente en una cantidad de aproximadamente 200 mg/m² a aproximadamente 1000 mg/m², más preferiblemente aproximadamente 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 mg/m². En algunas realizaciones, la dosificación unitaria está en una forma de dosificación unitaria para inyección intravenosa. En algunas realizaciones, la dosis unitaria está en una forma farmacéutica unitaria para inyección intratumoral.

Los materiales pueden estar en solución, emulsiones o suspensión (por ejemplo, incorporados en micropartículas, liposomas o células). Normalmente, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer que la formulación sea isotónica. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y más preferiblemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes y agentes tensioactivos. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices en forma de partículas conformadas, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Será evidente para los expertos en la materia que ciertos vehículos pueden ser más preferibles dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y la concentración de la composición que se administra. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más ingredientes activos tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios y anestésicos.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijos. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes.

Para facilitar la disolución de anticuerpos en el ambiente acuoso, se puede agregar un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como laurilsulfato de sodio, dioctil sulfosuccinato de sodio y dioctilsulfonato de sodio. Se podrían usar detergentes catiónicos y podrían incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. La lista de detergentes no iónicos potenciales que podrían incluirse en la formulación como tensioactivos son lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 20, 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Estos tensioactivos podrían estar presentes en la formulación de la proteína o derivado ya sea solo o como una mezcla en diferentes proporciones. Los aditivos que potencialmente aumentan la absorción de péptidos son, por ejemplo, los ácidos grasos ácido oleico, ácido linoleico y ácido linoléico.

III. Métodos

A. Administración terapéutica

Los anticuerpos anti-ADN que penetran en las células de la invención pueden usarse en métodos para tratar cáncer o una infección en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de anticuerpos anti-ADN que penetra en las células. Los anticuerpos anti-ADN que penetran en las células de la invención también pueden usarse en métodos para aumentar la radiosensibilidad o quimiosensibilidad de una célula en un sujeto mediante la administración al sujeto de una composición farmacéutica que contiene anticuerpos anti-ADN que penetran en la célula. En algunas realizaciones, el método implica seleccionar primero un sujeto que ha sido diagnosticado con una neoplasia, como un cáncer o tumor, o una infección con un patógeno como un virus.

La composición farmacéutica se puede administrar de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico, y del área a tratar. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse por vía intravenosa, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, subcutánea. Las composiciones pueden administrarse directamente en un tumor o tejido, por ejemplo, estereotácticamente. Las composiciones pueden administrarse en el cerebro o el hígado mediante inyección o mediante una derivación implantada quirúrgicamente.

La cantidad exacta de las composiciones requeridas variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad, peso y estado general del sujeto, la gravedad del trastorno que se está tratando y su modo de administración. Por lo tanto, no es posible especificar una cantidad exacta para cada composición. Sin embargo, un experto en la materia puede determinar una cantidad apropiada utilizando solo la experimentación de rutina dada las enseñanzas de este documento. Por ejemplo, las dosis efectivas y las pautas para administrar las composiciones pueden determinarse empíricamente, y hacer tales determinaciones está dentro de la habilidad en la técnica. Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son los suficientemente grandes como para perjudicar la

reparación del ADN en las células diana y/o sensibilizar las células diana a la radioterapia y/o quimioterapia. La dosis no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos, como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas y similares. En general, la dosis variará con la edad, el estado y el sexo del paciente, la vía de administración, si se incluyen otros fármacos en el régimen y el tipo, etapa y ubicación del cáncer a tratar. La dosis puede ser ajustada por el médico individual en caso de cualquier contraindicación. La dosificación puede variar y puede administrarse en una o más administraciones de dosis diariamente, durante uno o varios días. Se puede encontrar orientación en la bibliografía para las dosis apropiadas para clases dadas de productos farmacéuticos. Una dosis diaria típica del anticuerpo usado solo puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a hasta 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En realizaciones preferidas, el anticuerpo está presente en una cantidad de aproximadamente 200 mg/m² hasta aproximadamente 1000 mg/m², más preferiblemente de aproximadamente 200-900, 300-800, 400-700, 500-600 mg/m². En algunas realizaciones, la dosificación unitaria está en una forma farmacéutica unitaria para inyección intravenosa. En algunas realizaciones, la dosificación unitaria está en una forma de dosificación unitaria para administración oral. En algunas realizaciones, la dosificación unitaria está en una forma farmacéutica unitaria para inyección intratumoral.

Los anticuerpos anti-ADN aumentan la radiosensibilidad o quimiosensibilidad del cáncer. Las dosis efectivas de quimioterapia y/o radioterapia pueden ser tóxicas para ciertos tipos de cáncer. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-ADN disminuyen la dosis efectiva requerida de un fármaco antineoplásico o los niveles de radiación necesarios para tratar un cáncer, reduciendo así la toxicidad de la dosis efectiva. Por ejemplo, la dosis más utilizada de doxorrubicina es de 40 a 60 mg/m² IV cada 21 a 28 días, o 60 a 75 mg/m² IV una vez cada 21 días. Si el paciente tiene un nivel de bilirrubina entre 1,2 y 3 mg/dl, la dosis debe reducirse en un 50 %. Si el paciente tiene un nivel de bilirrubina entre 3,1 y 5,0 mg/dl, la dosis debe reducirse en un 75 %. Se puede encontrar una toxicidad miocárdica irreversible grave que conduce a insuficiencia cardíaca congestiva que a menudo no responde a la terapia de soporte cardíaco a medida que la dosis total de doxorrubicina se aproxima a 450 mg/m². Cuando se usa en combinación con los anticuerpos anti-ADN, la dosis de doxorrubicina puede reducirse para disminuir la toxicidad del miocardio sin una pérdida de eficacia.

En otras realizaciones, los anticuerpos anti-ADN divulgados pueden usarse con dosis normales de fármaco o radiación para aumentar la eficacia. Por ejemplo, los anticuerpos anti-ADN pueden usarse para potenciar un fármaco o radioterapia para un cáncer que es resistente a los fármacos o la radiación. Los cánceres resistentes a la radioterapia que utilizan métodos estándar incluyen sarcomas, linfomas, leucemias, carcinomas, blastomas y tumores de células germinales.

B. Ensayo de detección

Dado que se demuestra que los anticuerpos anti-ADN inhiben la reparación del ADN y aumentan la radiosensibilidad y/o la quimiosensibilidad en las células cancerosas, también se divulga un método para detectar anticuerpos anti-ADN en una muestra. Por ejemplo, la muestra puede ser un fluido corporal que contiene anticuerpos, como sangre, suero o plasma de un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene, LES. La muestra puede ser una muestra de tejido o célula, como una biopsia.

El método se puede utilizar para controlar el diagnóstico o pronóstico de un sujeto con LES. Por ejemplo, la detección de anticuerpos anti-ADN que penetran en las células puede proporcionar una detección temprana de pacientes a punto de sufrir un brote de LES.

El método puede usarse para predecir la sensibilidad de un sujeto a la quimioterapia o radioterapia. En estas situaciones, los niveles de anticuerpos anti-ADN que penetran en las células en la muestra pueden corresponder al nivel de sensibilidad a la quimioterapia o radioterapia. Preferiblemente, la quimioterapia es una que inhibe la reparación del ADN o causa daño en el ADN.

El método puede implicar el contacto de las células con la muestra del sujeto y el control del efecto de la muestra en las células. Las células son preferiblemente una línea celular, tal como una línea celular cancerosa, que normalmente ha demostrado ser radiorresistente o quimiorresistente, pero que después del tratamiento con anticuerpos anti-ADN, se vuelve radiosensible y/o quimiosensible. En algunas situaciones, las células pueden irradiarse, y el método implica evaluar el efecto de la muestra sobre la radiosensibilidad celular. Como alternativa, las células pueden ponerse en contacto con un fármaco antineoplásico, y el método implica evaluar el efecto de la muestra sobre la quimiosensibilidad. Como alternativa, el método puede involucrar el control del efecto directo de la muestra sobre la muerte celular. En todas estas situaciones, un aumento en la radiosensibilidad, quimiosensibilidad o muerte celular es una indicación de que la muestra contiene anticuerpos anti-ADN.

En otras situaciones, el método implica un inmunoensayo, como un ELISA o citometría de flujo diseñado para detectar anticuerpos anti-ADN. Preferiblemente, el método está basado en células para detectar la penetración celular.

La presente invención se entenderá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: un anticuerpo anti-ADN que penetra en las células (3E10) mejora la radiosensibilidad celular *in vitro*

5

Materiales y métodos

10 *Líneas celulares:* Las líneas celulares MCF-7, HeLa, U251 y U87 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Se obtuvieron células PEO1 y PEO1 C4-2 (Sakai W, et al. *Cancer Res* 69:6381 (2009)). Las células fueron cultivadas y mantenidas en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Mediatech®) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) a 37 ° C en 5 % de CO₂.

15 *Producción y purificación de 3E10 y 3E10 scFv:* 3E10 se purificó del sobrenadante de hibridoma como se describe por Weisbart RH, et al. *J Immunol* 144:2653 (1990) 3E10 scFv se expresó en *Pichia pastoris* y se purificó del sobrenadante como se describe por Hansen JE et al. *Brain Res* 1088:187 (2006). Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el ensayo de Bradford.

20 *Ensayos de supervivencia celular in vitro:* Los ensayos clonogénicos y los ensayos basados en yoduro de propidio se realizaron como se describe por Hansen JE et al. *Cancer Res* 67:1769 (2007); Stachelek GC, et al. *Cancer Res* 70: 409 (2010)).

25 *Irradiación celular:* Las células cultivadas en placas de 6 o 12 pocillos se irradiaron con rayos X a las dosis especificadas usando el irradiador biológico X-RAD 320 (rayos X de precisión) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30 La Tabla 1 presenta datos que demuestran que 3E10 scFv sensibiliza las células MCF-7 y HeLa a la radiación IR. Las células MCF-7 y HeLa se irradiaron en presencia de medios que contenían tampón de control o 3E10 scFv, y la supervivencia clonogénica se determinó mediante un ensayo de formación de colonias. La fracción sobreviviente ± error estándar de la media relativa a las células de control no irradiadas se presenta para cada tratamiento. La dosis de 3E10 scFv fue de 0,25 µM para las células MCF-7 y 1,0 µM para las células HeLa. La dosis de IR fue de 4 Gy para las células MCF-7 y 6 Gy para las células HeLa.

Resultados

35 El LES es una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por la producción aberrante de autoanticuerpos reactivos contra el ADN del hospedador (anticuerpos antinucleares; ANA). Un subconjunto raro de estos anticuerpos puede penetrar en las células, pero casi todos son citotóxicos e inapropiados para uso clínico (Alarcón-Segovia, D. *Lupus* 10:315 (2001)). Sin embargo, un anticuerpo anti-ADN inusual que penetra en las células, 3E10, aislado de un modelo de LES en ratón, no resultó ser tóxico para las células en cultivo o para ratones *in vivo*, e incluso se demostró que es seguro en un ensayo clínico en fase I en humanos que evalúa el uso potencial de 3E10 en una vacuna para tratar el LES (Spertini F, et al. *J Rheumatol* 26:2602 (1999); Weisbart RH, et al. *J Immunol* 144: 2653 (1990); Zack DJ, et al. *J Immunol* 157:2082 (1996)). 3E10 no se siguió investigando como una vacuna, sino que se investigó como un vehículo de administración molecular (Hansen JE et al. *Brain Res* 1088:187 (2006); Hansen JE et al. *J Biol Chem* 282:20790 (2007)).

45 Además de su perfil de toxicidad benigna, 3E10 se distingue además de otros AAN que penetran en las células por su mecanismo de penetración celular. A diferencia de todos los demás, la penetración celular por 3E10 es independiente de su Fc o dominios constantes; más bien, el fragmento variable de cadena única 3E10 (3E10 scFv) puede, por sí mismo, penetrar en las células y localizarse en los núcleos), en un mecanismo mediado por un transportador de nucleósidos equilibrado que es ubicuo en las células humanas (Hansen JE et al. *J Biol Chem* 282:20790 (2007); Lisi S et al. *Clin Exp Med* 11:1 (2011)).

50 Tanto el anticuerpo 3E10 completo como el 3E10 scFv han demostrado ser capaces de suministrar proteínas de carga como p53 y Hsp70 en las células *in vitro* e *in vivo* (Hansen JE et al. *Brain Res* 1088:187 (2006); Hansen JE et al. *Cancer Res* 67:1769 (2007); Zhan X, et al. *Stroke* 41:538 (2010)). Se pretendía utilizar 3E10 para transportar moléculas unidas con efectos radiosensibilizadores conocidos a las células cancerosas para mejorar la respuesta tumoral a la radioterapia. Sin embargo, en los experimentos iniciales, se descubrió que 3E10, por sí mismo, mejora la radiosensibilidad celular. Esto se muestra en la Tabla 1 y la Figura 1B. La Tabla 1 presenta datos que demuestran que 3E10 scFv sensibiliza las células MCF-7 y HeLa a la radiación IR. Las células MCF-7 y HeLa se irradiaron en presencia de medios que contenían tampón de control o 3E10 scFv, y la supervivencia clonogénica se determinó mediante un ensayo de formación de colonias. La fracción sobreviviente ± error estándar de la media relativa a las células de control no irradiadas se presenta para cada tratamiento. La dosis de 3E10 scFv fue de 0,25 µM para las células MCF-7 y 1,0 µM para las células HeLa. La dosis de IR fue de 4 Gy para las células MCF-7 y 6 Gy para las células HeLa.

65 La Figura 1B muestra un ensayo de supervivencia clonogénica que mide el impacto de 3E10 scFv en la

supervivencia de las células de glioma humano U251 tratadas con radiación ionizante (IR). Las células U251 se incubaron con medios de crecimiento que contenían 3E10 scFv o tampón de control durante una hora, y luego las células se irradiaron con 0 o 4 Gy de radiación IR y se evaluó la clonogenicidad mediante la formación de colonias. De acuerdo con estudios previos, el 3E10 scFv por sí solo no era tóxico para las células U251 no irradiadas. Sin embargo, se descubrió que las células U251 irradiadas en presencia de 3E10 scFv eran más sensibles a la radiación IR. 3E10 scFv también aumentó la radiosensibilidad de las células de cáncer de mama humano MCF-7 y las células de cáncer cervical humano HeLa a dosis tan bajas como 0,25 μM (Tabla 1). La radiosensibilización por un anticuerpo anti-ADN que penetra en las células no se ha descrito previamente.

10 **Ejemplo 2: Un anticuerpo anti-ADN que penetra en las células (3E10) potencia la quimioterapia que daña el ADN *in vitro***

Materiales y métodos

15 Como la radiación se dirige al ADN, se probó el impacto de 3E10 en la respuesta de las células cancerosas a la quimioterapia que daña el ADN. Específicamente, se comparó la influencia de 3E10 en la sensibilidad celular a la doxorubicina frente al paclitaxel, dos agentes comúnmente utilizados en la terapia contra el cáncer. La doxorubicina es un antibiótico antraciclina que se intercala en el ADN e induce la rotura de las hebras (Tewey KM, et al. Science 226: 466(1984)), mientras que el paclitaxel interfiere con la función de los microtúbulos (Jordan MA, et al. Proc Natl Acad Sci USA 90:9552 (1993)) pero no daña directamente el ADN.

20 Se predijo que 3E10 scFv sensibilizaría las células a doxorubicina pero no a paclitaxel. Las células de glioma humano U87 se trataron con dosis crecientes de doxorubicina (0-250 nM) o paclitaxel (0-25 nM) en presencia de tampón de control o 3E10 scFv 10 μM , y el porcentaje de destrucción celular se determinó mediante fluorescencia de yoduro de propidio una semana después del tratamiento.

Resultados

30 Como se predijo, 3E10 scFv mejoró significativamente la sensibilidad de las células a la doxorubicina pero no al paclitaxel (Fig. 1C y 1D). La capacidad de 3E10 scFv para sensibilizar las células cancerosas tanto a la radiación IR como a doxorubicina pero no a paclitaxel indica que el anticuerpo potencia selectivamente la muerte celular mediante terapias que dañan el ADN.

35 **Ejemplo 3: Un anticuerpo anti-ADN que penetra en las células (3E10) inhibe la reparación del ADN**

Al establecer que 3E10 scFv sensibiliza las células a los agentes que dañan el ADN, se investigó el mecanismo subyacente a este efecto. Tanto la radiación IR como la doxorubicina inducen roturas de la cadena de ADN, por lo que se planteó la hipótesis de que 3E10 scFv podría tener un efecto sobre la reparación del ADN, particularmente la reparación de la rotura de cadena. Como primer paso, se examinaron las propiedades de unión al ADN de 3E10. Se determinó la afinidad de unión de 3E10 por varios sustratos de ADN diferentes, incluido ADN de cadena sencilla, ADN dúplex de extremo romo, ADN dúplex con una burbuja interna debido a heterología, ADN dúplex con extremos de cadena sencilla separados, ADN dúplex con una cola de una sola cadena en 5' y ADN dúplex con una cola en 3' (Fig. 2A) incubando sustratos de ADN radiomarcados preparados como se describe por Xu X, et al. EMBO J 28:568 (2009) con concentraciones crecientes de 3E10 (0-1 μM) seguido de análisis de desplazamiento de movilidad electroforética.

Materiales y métodos

50 *Estudios de unión a ADN:* Se prepararon sustratos de ADN radiomarcado (ADN de cadena sencilla, ADN dúplex de extremo romo, ADN dúplex con una burbuja interna debido a heterología, ADN dúplex con extremos de cadena sencilla separados, ADN dúplex con una cola de una sola cadena en 5' y ADN dúplex con una cola en 3') como se describe por Xu X, et al. EMBO J 28:3005 (2009) Cada sustrato se incubó con 3E10 (0-10 μM) durante 30 minutos a 4 °C, seguido de un análisis de desplazamiento de la movilidad electroforética como se describe por Xu X, et al. EMBO J 28: 3005 (2009). La Kd se calculó trazando el porcentaje de oligonucleótido unido usando ImageJ; Institutos Nacionales de Salud frente a la concentración de 3E10.

60 *Ensayos de reparación de ADN:* La reparación de rotura de cadena sencilla/escisión de bases (BER) y los ensayos de intercambio de cadena mediados por RAD51 se realizaron como se describe, respectivamente, Stachelek GC, et al. Cancer Res 70: 409 (2010); y Dray E, et al. Proc Natl Acad Sci USA 108: 3560 (2011).

Microscopía: La inmunohistoquímica y la inmunofluorescencia γH2AX se realizaron como se describió previamente (Hansen JE et al. J Biol Chem 282:20790 (2007); Stachelek GC, et al. Cancer Res 70:409 (2010)).

Resultados

65 Se observó un desplazamiento a la izquierda en las curvas de unión para los sustratos de una sola cadena, brazo

abierto y cola de 5'/3' en relación con los sustratos de dúplex y burbuja, lo que sugiere que 3E10 se une con mayor afinidad a los sustratos con colas de cadena sencilla libres (Figs. 2C-2H). Los resultados se combinaron y se representaron gráficamente para comparar directamente la unión de 3E10 a sustratos con o sin cola de una cadena sencilla libre. En general, 3E10 está unido a sustratos con una cola de una cadena sencilla libre con una K_d de 0,2 μM y a sustratos sin una cola de una cadena sencilla libre con una K_d de 0,4 μM (Fig. 2B). Estos resultados sugieren que tras la penetración celular y la localización nuclear, 3E10 puede unirse preferentemente a intermedios de reparación o replicación de ADN que consisten en ADN dúplex con colas de cadena sencilla.

A continuación se examinó el impacto de 3E10 en las vías específicas de reparación del ADN, comenzando con ensayo *in vitro* de reparación de cadena sencilla/escisión de bases (BER) (Stachelek GC, et al. Cancer Res 70:409 (2010)). En el ensayo BER, una base dañada es escindida por una glucosilasa seguida de la escisión del esqueleto del fosfodiéster por una endonucleasa para producir un sustrato con una rotura de cadena sencilla (producto n). La actividad dRP liasa de la ADN polimerasa β elimina el grupo dRP, y su actividad polimerasa inserta el nucleótido faltante y restaura el emparejamiento de bases correcto (producto $n+1$). Esto es seguido por la ligadura de la rotura de la cadena residual por la ligasa para restaurar la integridad del esqueleto del fosfodiéster, lo que lleva a la conversión del producto $n+1$ en el producto de longitud completa en conformación dúplex. Por lo tanto, la eficiencia de BER puede determinarse rastreando los niveles de las especies n y $n+1$ a lo largo del tiempo como cuantificadas en relación con el porcentaje de sustrato total y ADN del producto. Para medir el impacto de 3E10 en BER, se probó la reparación de un apareamiento erróneo U:G en un sustrato de ADN radiomarcado (incubado con uracilo ADN glicosilasa, AP endonucleasa, ADN polimerasa β y ligasa) en presencia de tampón de control, anticuerpo anti-tubulina control, o 3E10. 3E10 retrasó significativamente la conversión de la especie $n+1$ al producto ligado final en relación con el tampón de control, lo que sugiere que 3E10 afecta el paso de ligadura de la vía de reparación de rotura de cadena sencilla (Fig. 2I). El anticuerpo anti-tubulina no tuvo efecto sobre BER en relación con el tampón de control.

Para investigar aún más el impacto de 3E10 en la reparación del ADN, se examinó el efecto de 3E10 en la reparación dependiente de la homología (HDR), una vía clave para la reparación de roturas de doble cadena de ADN (DSB), incluidas las DSB inducidas por IR y las DSB asociados con las horquillas de replicación bloqueadas (Arnaudeau C, et al. J Mol Biol 307: 1235 (2001); Li X, et al. Cell Res 18:99 (2008)). La HDR depende de la recombinasa RAD51, que se une al ADN de cadena sencilla para formar nucleofilamentos que median la invasión de la cadena (Sung P et al. Science 265:1241 (1994); Sung P et al. J Biol Chem 278:42729 (2003); Sung P et al. Cell 82:453 (1995)). Dado que 3E10 se une preferentemente a las colas de cadena sencilla libres, se postuló que el anticuerpo podría perjudicar la invasión e intercambio de cadena mediada por RAD51. Esta hipótesis fue probada en un ensayo de intercambio de cadena *in vitro* (Dray E, et al. Proc Natl Acad Sci USA 108: 3560 (2011)), cuyo esquema se muestra en la Fig. 3A. El RAD51 humano purificado (hRAD51) se incubó durante 5 minutos con un sustrato de ADN de cadena sencilla de 150 pb sin marcar para permitir la formación de una nucleoproteína de ADN de cadena sencilla hRAD51 capaz de invasión de la cadena. A continuación se añadió a la reacción 3E10 (0-35 μM) o un anticuerpo IgG anti-His₆ de control y se dejó incubar durante 5 minutos. A continuación, se añadió un sustrato de ADN de 40 pb en conformación dúplex con extremos romos con una cadena radiomarcada y se dejó incubar con el filamento de nucleoproteína de ADN de cadena sencilla hRAD51 en presencia o ausencia de anticuerpo durante 30 minutos (el esquema se muestra en la Fig. 3A). El grado de intercambio de cadenas se visualizó a continuación por electroforesis y se cuantificó. 3E10 inhibió el intercambio de cadenas de una manera dependiente de la dosis (Fig. 3B), mientras que el anticuerpo IgG anti-His₆ de control no tuvo impacto en el intercambio de cadena. 3E10 también pudo suprimir el intercambio de cadena mediado por una variante RAD51, hRAD51K133R, que es defectuosa en la hidrólisis de ATP y, por lo tanto, es un mediador aún más potente del intercambio de cadena que RAD51 de tipo silvestre (Chi P et al. DNA Repair (Amst) 5: 381 (2006)) (Fig. 3C). Estos datos demuestran la inhibición de HDR por 3E10 mediante la supresión del intercambio de cadena mediada por RAD51.

Dado que se descubrió que 3E10 inhibía la HDR *in vitro* se postuló que la reparación de las DSB del ADN inducidas por la terapia que daña el ADN se retrasaría en las células tratadas con 3E10. Para probar esta hipótesis, las células de glioma U251 se trataron con tampón de control o 3E10 scFv (10 μM) y se irradiaron con 2 Gy de IR. Veinticuatro horas después, se cuantificó el número de DSB de ADN persistentes por célula mediante la visualización de focos del componente de histona fosforilada, γH2AX , por inmunofluorescencia. Las células irradiadas en presencia de 3E10 scFv mostraron un promedio de $10,5 \pm 1$ focos de γH2AX por célula a las 24 horas, en comparación con $6,8 \pm 1$ en las células irradiadas en el tampón de control ($p < 0,01$). Estos datos demuestran una resolución retardada de las DSB de ADN en células tratadas con 3E10 scFv, de acuerdo con los resultados *in vitro* que demuestran la inhibición de la reparación del ADN por 3E10.

Ejemplo 4: Un anticuerpo anti-ADN que penetra en las células (3E10) es sintéticamente letal para las células cancerosas deficientes en la reparación del ADN

Materiales y métodos

Las células cancerosas que albergan deficiencias en HDR debido a mutaciones BRCA2 (Moynahan ME, et al. Mol Cell 7:263 (2001)) son muy vulnerables a la muerte por inhibición de la reparación de rotura de cadena sencilla (Bryant HE, et al. Nature 434:913 (2005); Feng Z, et al. Proc Natl Acad Sci USA 108: 686 (2011); Kaelin, Jr. WG, et

al. Nat Rev Cancer 5:689 (2005)). Dicha inhibición se puede lograr mediante el tratamiento con inhibidores de la poli(ADP-ribosa)polimerasa 1 (PARP-1) o la ADN polimerasa β , un fenómeno denominado letalidad sintética (Stachelek GC, et al. Cancer Res 70:409 (2010); Bryant HE, et al. Nature 434:913 (2005); Kaelin, Jr. WG, et al. Nat Rev Cancer 5:689 (2005); Farmer H, et al. Nature 434:917 (2005)). Además, se ha demostrado que las células sin actividad BRCA2 son sensibles a una mayor inhibición de HDR, como lo demuestra el efecto letal sintético de la inactivación de RAD52 en células cancerosas sin actividad BRCA2 (Feng Z, et al. Proc Natl Acad Sci USA 108:686 (2011)). Basándose en la observación de que 3E10 inhibe tanto la reparación de rotura de cadena sencilla como la HDR, se postuló que 3E10 sería sintéticamente letal para las células cancerosas sin actividad BRCA2. Para probar esta hipótesis, se evaluó el impacto del tratamiento con 3E10 scFv o el anticuerpo 3E10 completo en células de cáncer de ovario humano sin actividad BRCA2 (PEO1) y BRCA2 (PEO1 C4-2) con bases apareadas (Sakai W, et al. Cancer Res 69:6381 (2009)). El impacto de 3E10 scFv también se probó en células de cáncer de ovario humano PEO4 con actividad BRCA2 y células de cáncer pancreático humano CAPAN1/neo sin actividad BRCA2.

Resultados

El tratamiento con 3E10 scFv redujo la supervivencia clonogénica de las células PEO1 sin actividad BRCA2 ($p = 0,03$) pero no tuvo un impacto adverso en la supervivencia de las células PEO1 C4-2 con actividad BRCA2 (Fig. 4A-4B). 3E10 scFv también fue tóxico para las células PEO1 sin actividad BRCA2, pero no en las células PEO4 con actividad BRCA2 en un ensayo de viabilidad celular (Fig. 4C). 3E10 scFv solo también fue tóxico para las células de cáncer pancreático humano sin actividad BRCA2 (CAPAN1/neo) (Fig. 4D). El anticuerpo 3E10 completo era igualmente selectivamente tóxico para las células PEO1 sin actividad BRCA2 de una manera dependiente de la dosis (Fig. 4E). Estos datos proporcionan la primera evidencia de un efecto letal sintético de un anticuerpo anti-ADN que penetra en las células en células cancerosas deficientes en la reparación del ADN y demuestran la utilidad potencial de 3E10 como terapia dirigida contra el cáncer para tumores malignos con deficiencias de reparación del ADN. Es importante destacar que el efecto letal sintético de 3E10 en las células cancerosas sin actividad BRCA2 está en consonancia con los experimentos mecanicistas descritos anteriormente que muestran que 3E10 afecta a la reparación de la rotura de cadena del ADN.

Además, se ha demostrado que las células cancerosas hipóxicas tienen una homología reducida = capacidad de reparación dirigida (Bindra et al. Mol. Cell. Biol. 24 (19):8504-8518 (2004)), por lo que se espera que 3E10 y anticuerpos similares sean sintéticamente letales para las células cancerosas que son hipóxicas.

Ejemplo 5: Un anticuerpo anti-ADN que penetra en las células, 3E10, sensibiliza profunda y selectivamente las células cancerosas deficientes en la reparación del ADN a la terapia que daña el ADN

Materiales y métodos

Para determinar si 3E10 tendría un impacto aún mayor en las células cancerosas sin actividad BRCA2 cuando se combina con un agente que daña el ADN, las células de cáncer de ovario PEO1 sin actividad BRCA2 y PEO1 C4-2 con actividad BRCA2 se trataron con tampón de control, 3E10 10 μ M, doxorubicina 3 nM o 3E10 10 μ M + doxorubicina 3 nM. El porcentaje de muerte celular se evaluó mediante fluorescencia de yoduro de propidio tres días después del tratamiento. Se seleccionó una dosis baja de doxorubicina (3 nM) para minimizar el efecto de la doxorubicina sola en las células, y se tomó la decisión de medir el porcentaje de muerte celular 3 días después del tratamiento para minimizar los efectos de confusión de la letalidad sintética por 3E10 solo en células sin actividad BRCA2, lo que es evidente aproximadamente siete días después del tratamiento.

Resultados

Como se esperaba, la dosis baja de doxorubicina sola no fue significativamente tóxica para las células con actividad BRCA2 o sin actividad BRCA2. La adición de 3E10 a la doxorubicina tuvo un impacto mínimo en las células con actividad BRCA2. Sin embargo, la combinación de 3E10 y doxorubicina fue altamente citotóxica para las células sin actividad BRCA2 (65 % \pm 7 muerte celular, $p < 0,001$) (Fig. 4F-4G).

Ejemplo 6: 3E10 potencia la quimioterapia que daña el ADN *in vivo*

A continuación se determinó si se conserva el impacto de 3E10 en la sensibilidad de las células tumorales a la terapia que daña el ADN *in vivo* en un modelo de tumor de ratón.

Materiales y métodos

El anticuerpo 3E10 completo se usó para estudios *in vivo* debido a su mayor semivida esperada en la circulación en comparación con el fragmento variable. Se generaron tumores de glioma U87 en ratones SCID mediante inyección subcutánea. Cuando los tumores se habían formado y estaban en una fase de crecimiento constante, los ratones fueron tratados mediante inyección intraperitoneal de tampón de control, anticuerpo 3E10 solo (0,8 mg en 0,5 ml de PBS, 10 μ M), doxorubicina sol (80 μ g/kg), o ambos, 3E10 y doxorubicina. Cada grupo de tratamiento estaba compuesto por 4 ratones. Luego se evaluó el impacto del tratamiento midiendo el crecimiento tumoral tres días

después de la inyección. La selección de este punto de tiempo para la medición del tumor se basó en los estudios *in vitro* que demostraron que el impacto del anticuerpo en la sensibilidad de las células cancerosas a la doxorubicina se puede detectar 3 días después del tratamiento. No se pudieron obtener mediciones tumorales adicionales después de 3 días debido a requisitos institucionales predeterminados para el sacrificio de animales cuando los tumores alcanzaron un volumen de 400 mm³, lo que se logró rápidamente en los grupos de control.

Resultados

Los tumores en ratones tratados con tampón de control aumentaron en volumen en un 54 % ± 23. El tratamiento con 3E10 o doxorubicina solo no tuvo un impacto significativo en el crecimiento tumoral, con volúmenes de tumor aumentados en 48 % ± 13 y 61 % ± 10, respectivamente. Por el contrario, el crecimiento tumoral se redujo significativamente en ratones tratados con 3E10 y doxorubicina combinados, con un aumento de tamaño de los tumores de solo 9 % ± 7 ($p = 0,004$, con p calculado en comparación con los volúmenes tumorales absolutos en ratones tratados con doxorubicina + 3E10 frente a doxorubicina solo). Estos datos demuestran la sensibilización de los tumores a doxorubicina por 3E10 *in vivo* (Fig. 5).

Ejemplo 7: Un anticuerpo anti-ADN que penetra en las células (3E10) sensibiliza los xenoinjertos de glioma humano a la radiación ionizante *in vivo*

Materiales y métodos

Se generaron xenoinjertos de glioma humano mediante inyección subcutánea de células U87 en los flancos de ratones desnudos. Los grupos de tratamiento fueron: control ($n = 8$); Anticuerpo ($n = 8$), 8 Gy (de radiación ionizante) ($n = 8$) y 8 Gy + Anticuerpo ($n = 7$; un animal perdido con la anestesia). Veinticinco días después de la implantación, los tumores habían crecido hasta un tamaño medio de ~100 mm³ de los ratones. El día 26, los ratones fueron tratados con inyección intraperitoneal de tampón de control (PBS; grupos "Control" y "8 Gy") o 3E10 (1 mg en PBS; grupos "Anticuerpo" y "8 Gy + Anticuerpo"). Cada grupo recibió una segunda inyección del mismo reactivo 24 horas después. Dos horas después de la segunda inyección, los tumores en los grupos "8 Gy" y "8 Gy + Anticuerpo" se irradiaron con 8 Gy. Luego se siguieron los volúmenes tumorales en cada grupo y se sacrificaron los ratones cuando el volumen tumoral alcanzó 1000 mm³. Las medidas de crecimiento tumoral frente a los días después de la implantación tumoral se muestran en la FIG. 6A.

Resultados

3E10 solo (rombos en blanco) no tuvo un impacto significativo en el crecimiento tumoral en relación con el tampón de control solo (rombos rellenos) Sin embargo, la combinación de 3E10 y 8 Gy (triángulos en blanco) suprimió el crecimiento tumoral en un mayor grado que 8 Gy solo (triángulos rellenos).

En la Fig. 6B, se presentan gráficos de Kaplan-Meier de supervivencia libre de progresión en cada grupo. La supervivencia libre de progresión se define como la supervivencia con tumor que no ha aumentado su tamaño en tres veces o más en relación con el tamaño basal. El tamaño basal se define como el tamaño del tumor un día antes del tratamiento con anticuerpos, que se representa como el día 25 en el panel A y el día 0 en el panel B. El tiempo de triplicación del tumor (tiempo requerido para que los tumores aumenten el volumen tres veces respecto al valor basal) fue de 9,5 ± 0,5 días en tumores tratados con 8 Gy en comparación con 13,7 ± 1,8 días en tumores tratados con 8 Gy + 3E10 ($p = 0,04$). Sin embargo, 3E10 solo, no tuvo impacto en los tumores U87 en relación con el tampón de control solo, con un tiempo de triplicación tumoral de los tumores de control 6,8 ± 0,7 días frente a 6,5 ± 0,3 días en tumores tratados con 3E10 solo ($p = 0,67$). Estos datos demuestran la sensibilización de los xenoinjertos de glioma humano a la radiación ionizante por 3E10 *in vivo*. Las barras de error representan el error estándar de la media.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-ADN que penetra en las células para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad neoplásica o una infección viral en un sujeto, en donde el anticuerpo anti-ADN que penetra en las células es el anticuerpo monoclonal 3E10, producido por el hibridoma ATCC N.º de acceso PTA 2439 o una forma humanizada del mismo, en donde el anticuerpo anti-ADN que penetra en las células no tiene un agente terapéutico unido al mismo.
2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el sujeto tiene un cáncer seleccionado del grupo que consiste en sarcomas, linfomas, leucemias, carcinomas y adenocarcinomas, blastomas, tumores de células germinales, gliomas, tumores neuroendocrinos, melanomas, tumores rabdoides, tumores embrionarios, tumores neuroectodérmicos, tumores carcinoides, craneofaringiomas, histiocitomas, meduloepteliomas, mesoteliomas, mielomas múltiples, enfermedad mieloproliferativa crónica, tumores neuroectodérmicos primitivos, tumores de glándulas salivales, timomas, carcinoma tímico, cáncer de tiroides y tumor de Wilms.
3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la célula penetrada por el anticuerpo es resistente a la radiación.
4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la célula penetrada por el anticuerpo es resistente a la quimioterapia.
5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la célula penetrada por el anticuerpo tiene reparación intrínseca de ADN defectuosa o deficiente.
6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la célula penetrada por el anticuerpo está expuesta o infectada con un virus que tiene o causa defectos o deficiencias de reparación del ADN, o depende de las vías de reparación del ADN del hospedador para la infección, la integración o la replicación.
7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende además un radiosensibilizador.
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-7, que comprende además un fármaco antineoplásico que daña el ADN o inhibe la reparación del ADN, en donde el anticuerpo anti-ADN que penetra en las células aumenta la sensibilidad de las células al fármaco antineoplásico.
9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-ADN que penetra en las células es un fragmento variable de cadena sencilla del anticuerpo monoclonal 3E10, producido por el hibridoma ATCC N.º de acceso PTA 2439 o una forma humanizada del mismo.
10. Un método *in vitro* para inhibir la reparación del ADN en una célula neoplásica o expuesta a o infectada por un virus, que comprende poner en contacto la célula con un anticuerpo anti-ADN que penetra en las células, en donde el anticuerpo anti-ADN que penetra en las células es el anticuerpo monoclonal 3E10, producido por el hibridoma ATCC N.º de acceso PTA 2439 o una forma humanizada del mismo, en donde el anticuerpo anti-ADN que penetra en las células potencia el daño del ADN o interfiere con el metabolismo del ADN, es selectivamente letal para la célula o sensibiliza selectivamente la célula a la radiación o a un agente antineoplásico, en relación con las células no neoplásicas o las células no expuestas a o no infectadas por un virus, y en donde el anticuerpo anti-ADN que penetra en las células no tiene un agente terapéutico unido al mismo.
11. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-ADN que penetra en las células es un fragmento variable de cadena sencilla divalente (discFv) del anticuerpo monoclonal 3E10, producido por el hibridoma ATCC N.º de acceso PTA 2439 o una forma humanizada del mismo.

Figura 1A

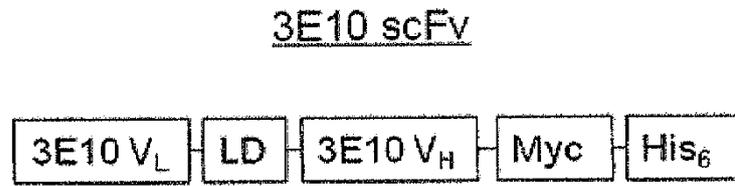


Figura 1B

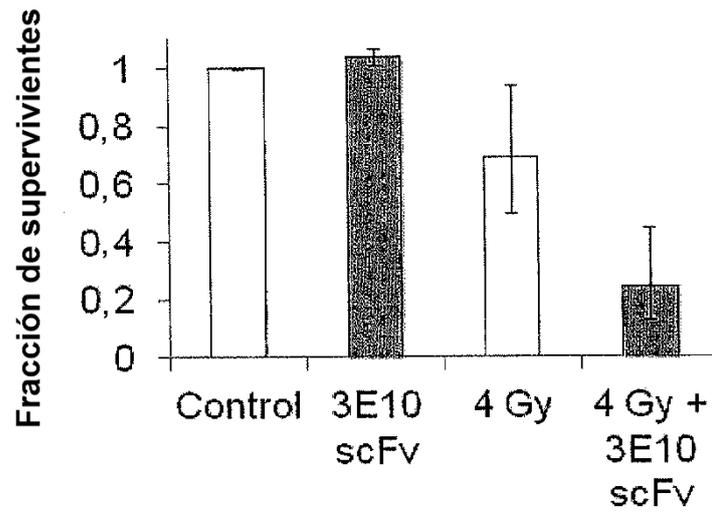


Figura 1C

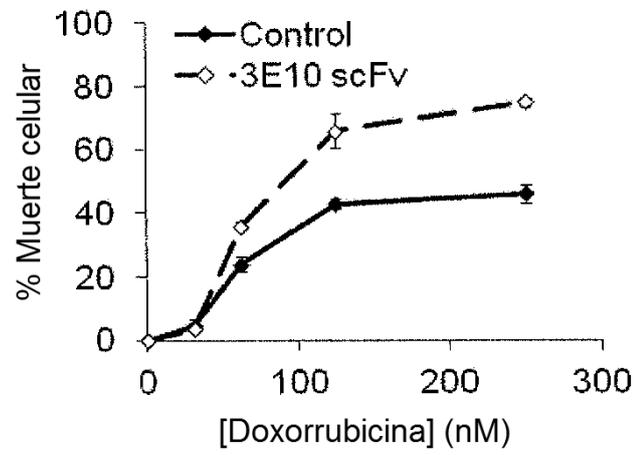


Figura 1D

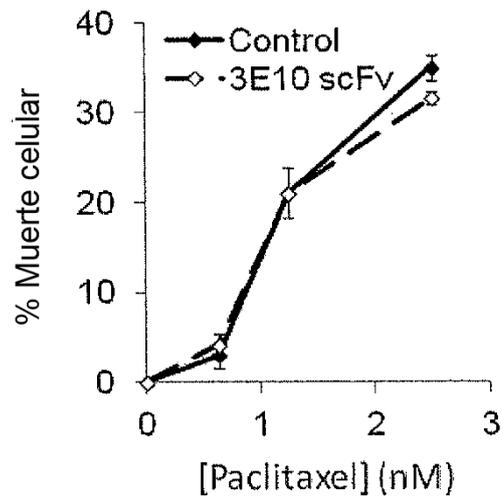


Figura 2A

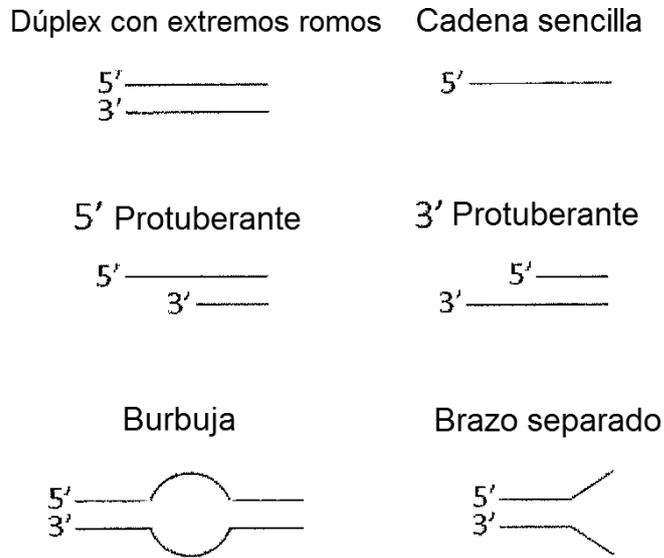


Figura 2B

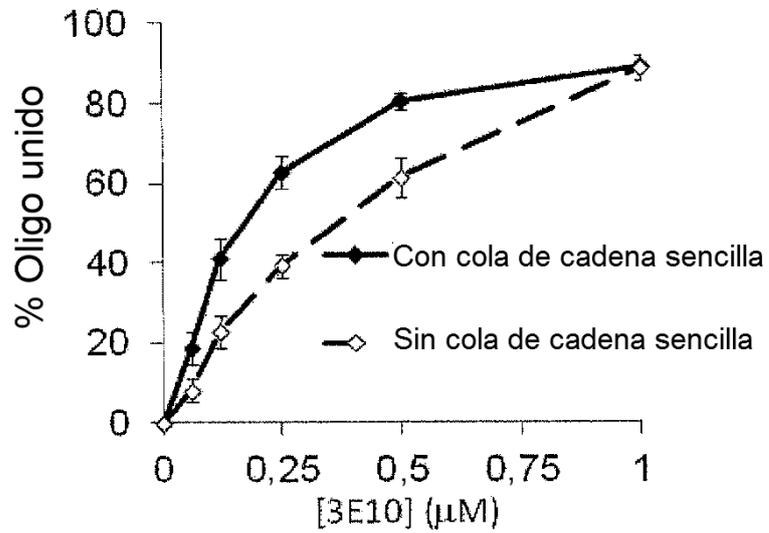


Figura 2C-2H

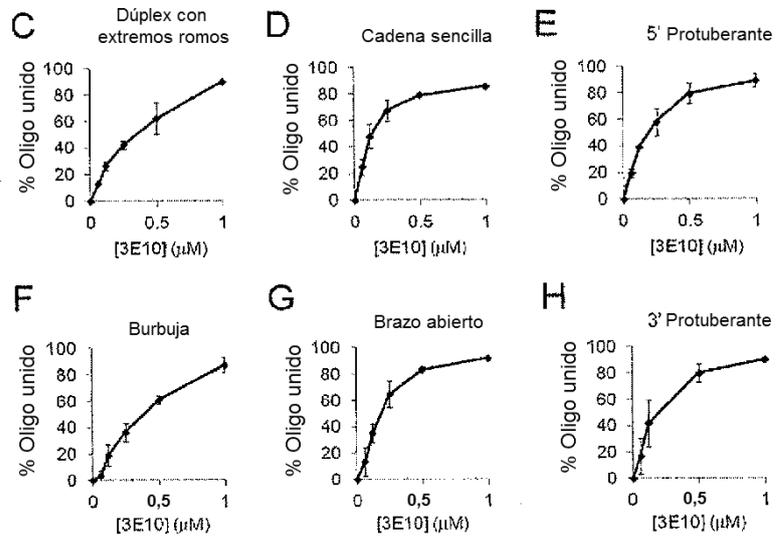


Figura 2I

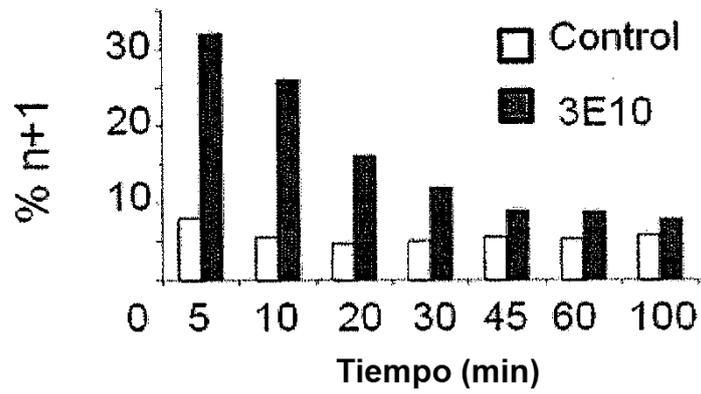


Figura 3A

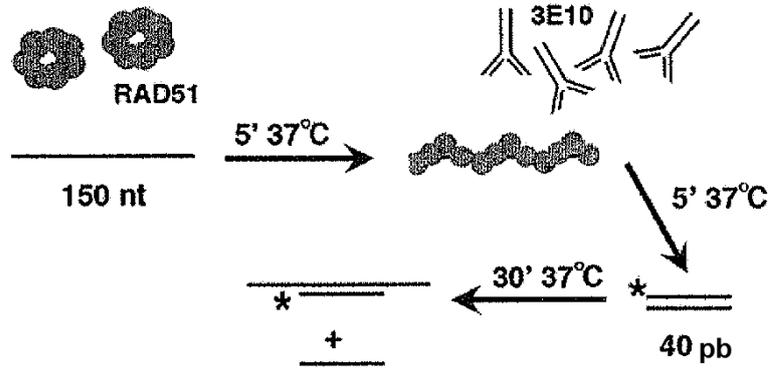


Figura 3B

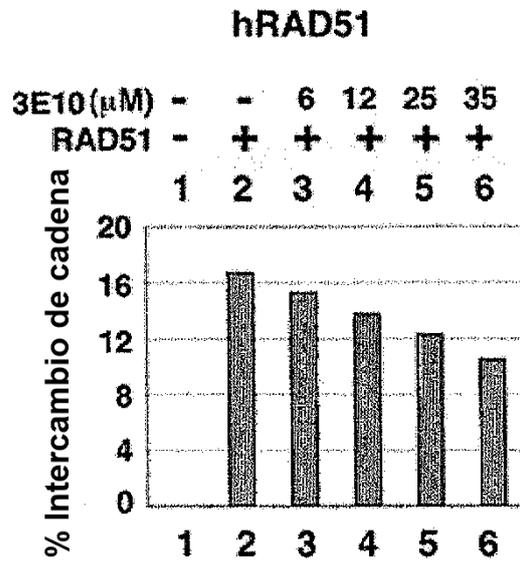


Figura 3C

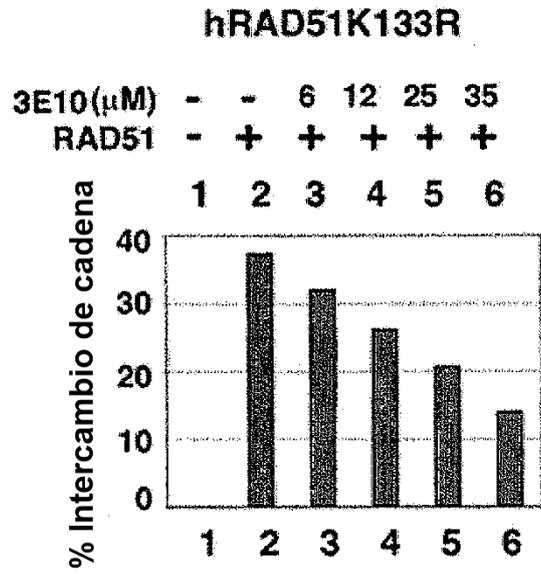


Figura 3D

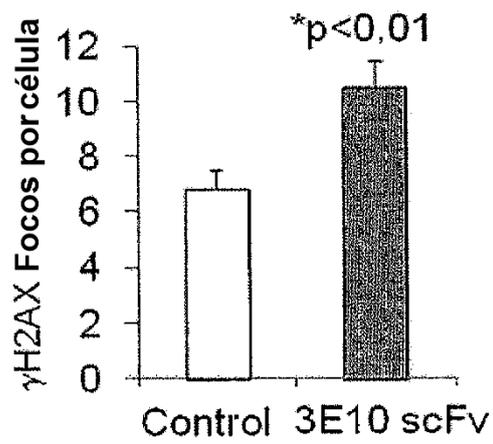


Figura 4A

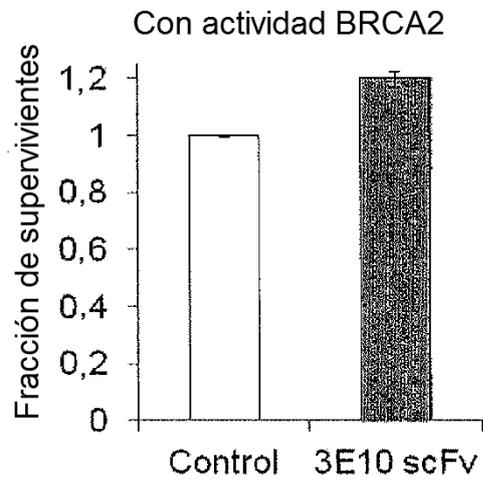


Figura 4B

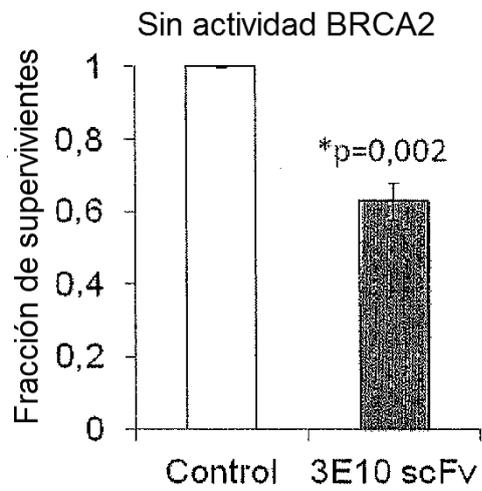


Figura 4C

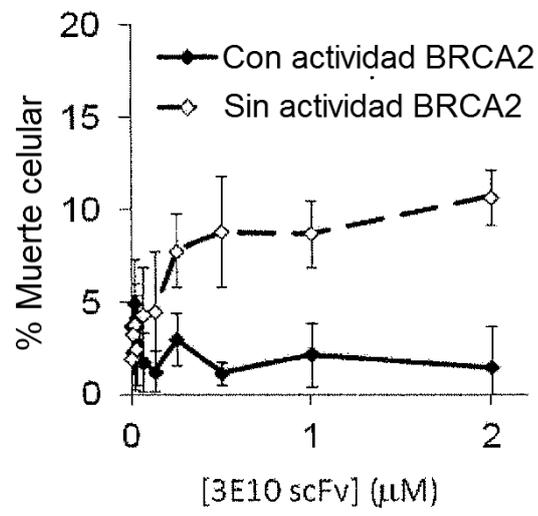


Figura 4D

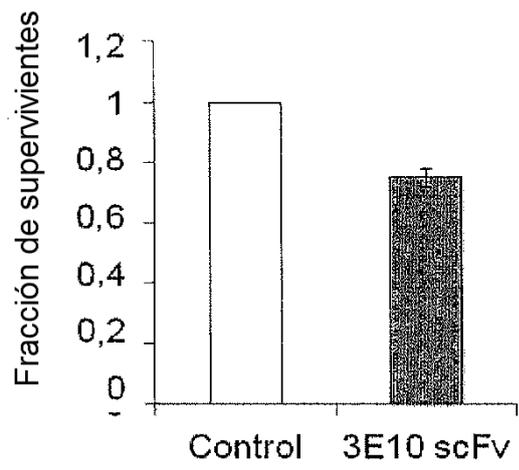


Figura 4E

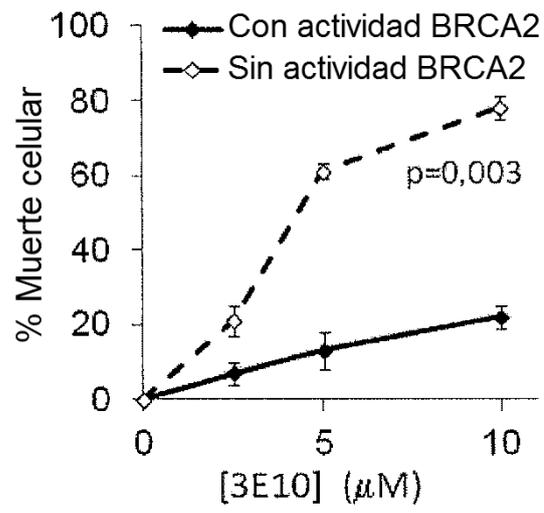


Figura 4F

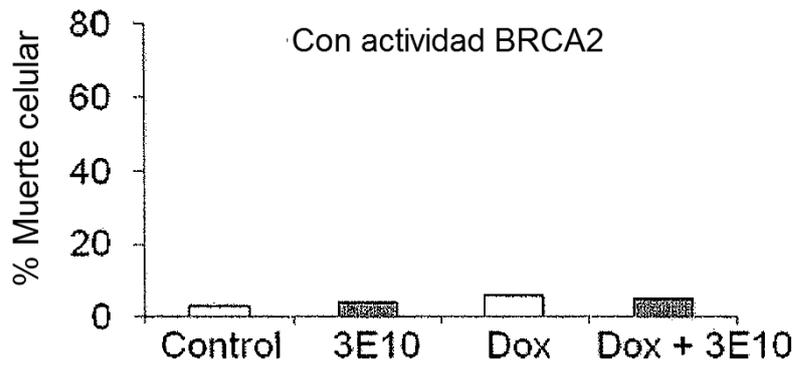


Figura 4G

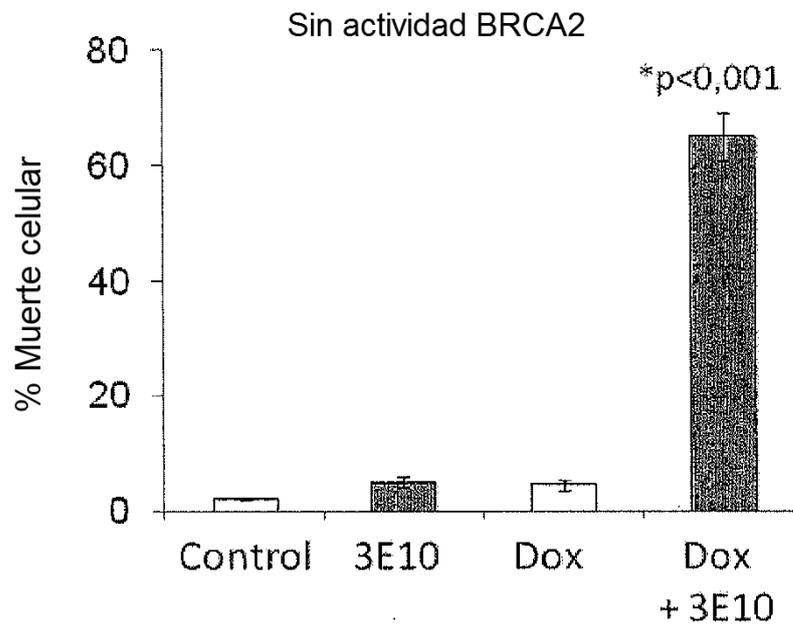


Figura 5

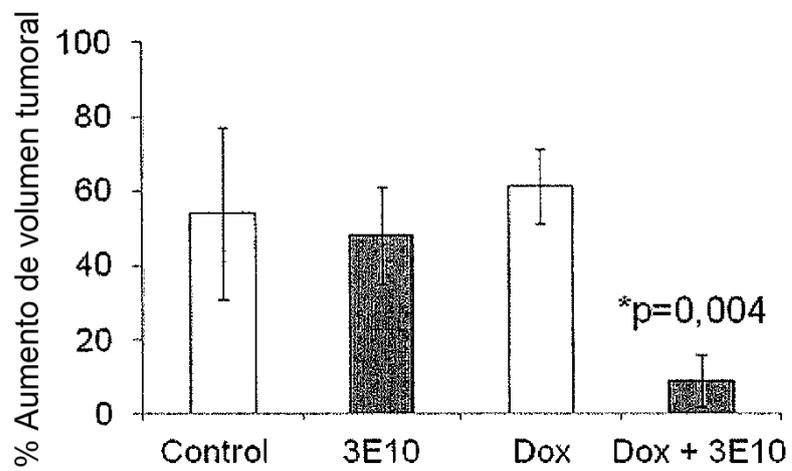


Figura 6A

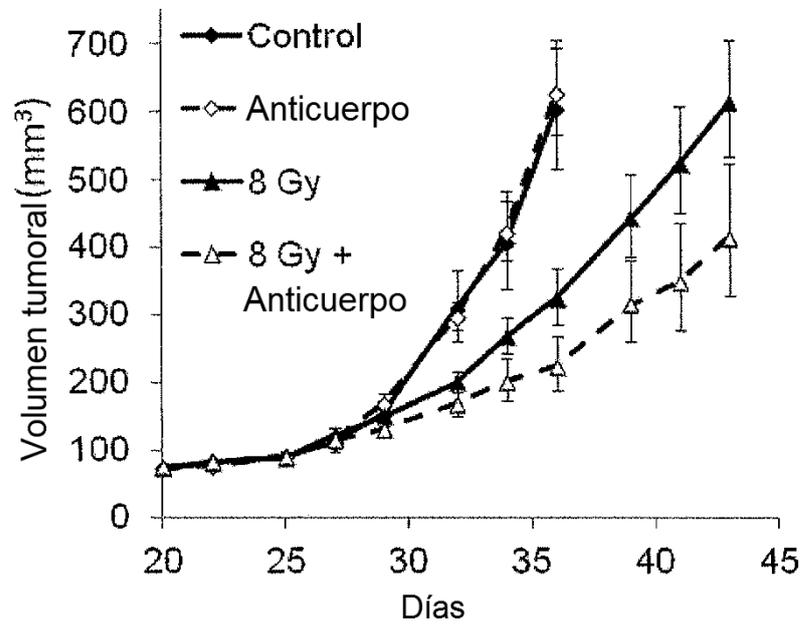


Figura 6B

