

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 396**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/117 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2009 E 16177258 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3098239**

54 Título: **Vector de ARN bicatenario dirigido a EGFR para tratamiento sistémico del cáncer**

30 Prioridad:

22.12.2008 US 139698 P

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

03.06.2020

73 Titular/es:

**TARGIMMUNE THERAPEUTICS AG (100.0%)
Hochbergerstrasse 60c
4057 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**LEVITZKI, ALEXANDER y
SHIR, ALEXEI**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 764 396 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

Vector de ARN bicatenario dirigido a EGFR para tratamiento sistémico del cáncer

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo del tratamiento del cáncer y se refiere a vectores que comprenden ARN bicatenario (ARNbc) con un agente de unión a EGFR que puede dirigir específicamente el ARNbc a células cancerosas que sobreexpresan EGFR, movilizándolo, por tanto, el sistema inmunitario para el tratamiento de tumores que sobreexpresan EGFR.

Abreviaturas: **ARNbc:** ARN bicatenario; **EGF:** factor de crecimiento epidérmico; **EGFR:** receptor de EGF; **PBMC:** leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica; **PEG:** polietilenglicol; **PEI:** polietilenimina; **pIC, PoliilC:** ARN bicatenario de ácido poliinosínico-policitidílico; **pIC/MPPE:** poliilC/polietilenimina ramificada con melitina-polietilenglicol-EGF; **pIC/PPE:** poliilC/polietilenimina lineal-polietilenglicol-EGF; **pIC/PPGE11:** poliilC/polietilenimina lineal-polietilenglicol-(péptido)GE11.

Antecedentes de la invención

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se sobreexpresa en una diversidad de tumores humanos sólidos, incluyendo carcinoma broncopulmonar no microcítico, cáncer de mama, glioblastoma, carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, adenocarcinoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga y cáncer de próstata (Hynes *et al.*, 2009). La estimación anual de la American Cancer Society de nuevos casos de cáncer y muertes proyecta 1 437 180 nuevos casos de cáncer en los Estados Unidos en 2008 y 565 650 muertes por cáncer. La causa de la mayoría de las muertes por cáncer es la metástasis del cáncer a los órganos internos, que es casi imposible de tratar por procedimientos convencionales. Una fracción importante de todas las muertes relacionadas con cáncer está asociada con la sobreexpresión de EGFR. Por tanto, el EGFR es uno de los candidatos más importantes para el tratamiento dirigido del cáncer.

Los dos tratamientos más avanzados dirigidos a EGFR son los inhibidores de cinasa pequeños de EGFR permeables en la membrana y los anticuerpos anti-EGFR, que evitan la activación del receptor y/o dan lugar a la regulación por disminución del receptor. Estos agentes inducen remisión temporal o parcial y confieren algunos beneficios de supervivencia, pero realmente no curan a los pacientes. Esto se debe muy probablemente a que EGFR no es esencial para la supervivencia de las células cancerosas abordadas.

El poliilC, un ARN bicatenario sintético de ácido poliinosínico-policitidílico, es un agente citotóxico conocido. Se ha demostrado que la administración intratumoral o peritumoral de poliilC no dirigido es eficaz en inmunoterapia antitumoral (Fujimura *et al.*, 2006). Dicho tratamiento está limitado a tumores localizados únicamente, como se ha mostrado por los intentos de aplicación sistémica de poliilC no dirigido para tratar el cáncer. El beneficio de supervivencia fue mínimo, mientras que se observó una pronunciada toxicidad sistémica (Butowski *et al.*, 2009; Salazar *et al.*, 1996). El débil efecto estuvo muy probablemente causado por el fracaso en introducir una dosis suficiente de poliilC en las células tumorales. La mayor parte del poliilC no dirigido probablemente se dispersaba a través de tejidos normales entrando en células no cancerosas e induciendo reacciones tóxicas.

Recientemente se desarrolló una estrategia que utiliza el alto nivel de expresión de EGFR, en lugar de su actividad *per se*, como el talón de Aquiles del tumor. Esto se consiguió utilizando un vector químico dirigido a EGFR cargado con poliilC (Shir *et al.*, 2006; documento WO 04/045491). La aplicación intratumoral de poliilC/melitina-polietilenimina-polietilenglicol-EGF (poliilC/MPPE) a glioblastoma que sobreexpresa EGFR (~1 x 10⁶ receptores/célula) cultivado de forma intracraneal y a carcinomas de mama y epidermoides que sobreexpresan EGFR cultivados como xenoinjertos en ratones atímicos, dio lugar a eliminación completa de estos tumores localizados, durando a los ratones. Además, los tumores que comprenden una mezcla 1:1 de células que sobreexpresan EGFR de tipo silvestre y células que albergan el EGFRvIII mutante, que no internaliza el vector, también se erradicaron completamente. Este "efecto de circunstancia" se debió a las citocinas antiproliferativas tales como interferón- α , generadas en el sitio del tumor por las células tumorales afectadas por poliilC/MPPE.

Además, Inbar *et al.*, 2004 (Seminars in Cancer Biology 14, pág. 223-230), resumen novedosas estrategias antineoplásicas que utilizan los múltiples efectos antiproliferativos del ARN bicatenario (delimitación): (1) el ARN de antisentido clásico que hibrida con su ARNm diana, que da lugar a niveles reducidos de una oncoproteína específica; (2) ARNbc corto de secuencia específica, conocido como ARN inhibidor pequeño (ARNip) que puede inhibir de forma selectiva y eficaz la expresión de oncogenes específicos, expresados en células cancerosas, pero no en células normales; y (3) ARNbc largo, frecuentemente expresado en células infectadas con virus, activa mecanismos que destruyen de forma eficaz las células infectadas, evitando de ese modo la propagación del virus.

Además, Ciceri *et al.*, 2007 (Blood 109(11), pág. 4698-4707) investigaron al potencial terapéutico de linfocitos donadores genomanipulados con el gen suicida de timidina cinasa del virus del herpes simple (TK) en pacientes que experimentan recidiva de neoplasias hemáticas que alteran el alo-HSCT. Todos los pacientes evaluables para

incorporación del injerto y leucemia contra el injerto (GvL) tenían células TK+ circulantes detectable empezando en una mediana de tiempo de 18 días. Un 65 % de los pacientes experimentó un beneficio clínico sustancial que provocaba remisión completa o respuestas parciales. El efecto antitumoral estaba muy correlacionado con la expansión *in vivo* de células TK+. Estos datos se consideran por los autores para validar la viabilidad, seguridad y eficacia de las células TK+ en el contexto del aloinjerto y representan la base para una aplicación más amplia de esta tecnología.

Sumario de la invención

La presente invención divulga un vector dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que comprende una molécula de ARN bicatenario (ARNbc) con un péptido o polipéptido de unión a EGFR, para su uso junto con células inmunitarias en el tratamiento de cáncer que sobreexpresa EGFR.

La presente invención divulga además un procedimiento para el tratamiento de cáncer, caracterizado por células que sobreexpresan EGFR, comprendiendo dicho procedimiento administrar de forma sistémica a un paciente que lo necesita una combinación de: (i) un vector dirigido a EGFR que comprende una molécula de ARNbc con un péptido o polipéptido de unión a EGFR que puede dirigir el vector a células tumorales que sobreexpresan EGFR; y (ii) células inmunitarias.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para administración sistémica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un vector dirigido a EGFR que comprende una molécula de ARNbc bicatenaria con un polipéptido de unión a EGFR.

En otras determinadas realizaciones, la invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de cáncer, caracterizado por células que sobreexpresan EGFR, comprendiendo dicho procedimiento administrar de forma sistémica a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un vector dirigido a EGFR que comprende una molécula de ARNbc bicatenaria con un polipéptido de unión a EGFR.

En determinadas realizaciones, el vector dirigido a EGFR comprende además un vehículo de ácido nucleico, por ejemplo, compuesto de polietilenimina (PEI) unida covalentemente a polietilenglicol (PEG), el ARNbc es poliIC asociado no covalentemente con el resto de PEI del vehículo y el péptido o polipéptido de unión a EGFR es EGF o el péptido GE11 unido covalentemente al resto de PEG del vehículo.

Los vectores, composiciones y procedimientos de la invención están destinados al tratamiento de un cáncer seleccionado de carcinoma broncopulmonar no microcítico, cáncer de mama, glioblastoma, carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, adenocarcinoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga o cáncer de próstata, y metástasis de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras **1A-C** representan gráficos de barras que muestran que los PBMC se activan selectivamente por el medo de células MDA-MB-468 y A431 transfectadas con poliIC/MPPE. Se sembraron 500 000 PBMC en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante una noche en 0,5 ml de medio como se describe en los procedimientos. Los PBMC entonces se expusieron a 0,5 ml de medio retirado de células A431, MDA-MB-468, U87MG o U138MG transfectadas con poliIC/ PEI-PEG-EGF+PEI-Mel 48 h después de la transfección. El medio de PBMC se recogió 24 y 48 horas después de la exposición y se midió IFN- γ , IL-2 y TNF- α usando ensayos de ELISA. **(1A)** Expresión de IL-2 en el medio de PBMC, 24 y 48 h después de la exposición. **(1B)** Expresión de IFN- γ en el medio de PBMC, 48 h después de la exposición. **(1C)** Expresión de TNF- α en el medio de PBMC, 48 h después de la exposición. "Sin tratamiento" muestra la expresión de las citocinas en PBMC no expuestos. "UT" muestra la expresión de las citocinas por PBMC expuestos al medio de células no transfectadas. Se aplicó poli(ácido glutámico) (pGlu)/MPPE como control.

Las figuras **2A-D** muestran que las células inmunitarias se infiltran en tumores que sobreexpresan EGFR tratados con poliIC/MPPE+PBMC, pero no en células U138MG (sin expresión de EGFR). Se inyectaron células A431 **(2A)** o MDA-MB-468 **(2B)** por vía subcutánea (s.c.) en el flanco derecho y se inyectaron U138MG **(2C-2D)** en el flanco derecho de ratones SCID-NOD (compárese la figura **2A** con la figura **2C**, y la figura **2B** con la figura **2D**). Cuando los tumores alcanzaron aprox. 100 mm³, se inició el tratamiento con 3 inyecciones consecutivas I.V. de poliIC/MPPE de 5 μ g/ratón/día. A las 24 h después de la última inyección de poliIC/MPPE, se inyectaron 3 millones de PBMC I.P. A las 24 h después, los tumores se extrajeron, y se fijaron en formol al 4 %. Entonces se prepararon secciones de parafina, se tiñeron con H&E y se sometieron a análisis histopatológico. Las líneas discontinuas muestran zonas de infiltración de células tumorales.

Las figuras **3A-D** muestran el efecto de circunstancia mediado por PBMC. Figura **3A**. Para demostrar el efecto de circunstancia mediado por PBMC, se sembraron 100 000 células MDA-MB-468 en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante una noche con 2 ml de medio (Shir *et al.*, 2006). Las células entonces se transfectaron con poliIC/MPPE, a las concentraciones indicadas. A las 48 h después de la transfección, se añadieron 0,5 ml de medio de las células transfectadas ("medio acondicionado") a 500 000 PBMC que se habían sembrado 24 h antes en placas de 24 pocillos y cultivado en 0,5 ml de medio. Entonces se intercambié 0,1 ml de medio de los

PBMC expuestos en el lugar de 0,1 ml de medio de células MDA-MB-468 no transfectadas adicionales ("células indicadoras") sembradas 24 h antes. La supervivencia de estas células se determinó mediante ensayo de azul de metileno, 48 horas después de la exposición con el medio de los PBMC (barras negras en el gráfico). En paralelo, para mostrar el efecto de circunstante directo, se usó 0,1 ml de medio acondicionado para reemplazar 0,1 ml de medio de células MDA-MB-468 no transfectadas ("células indicadoras") sembradas 24 h antes en placas de 96 pocillos y cultivadas en 0,2 ml de medio. La supervivencia de estas células se determinó 48 horas después de la adición del medio acondicionado usando azul de metileno (barras sombreadas); la figura **3B** muestra el efecto de circunstante de células MDA-MB-468 transfectadas con poliIC sobre células U138MG no transfectadas; las figuras **3C-3D** muestran el efecto de circunstante de células A431 transfectadas con poliIC sobre células A431 no transfectadas y células U138MG no transfectadas, respectivamente. "Sin tratamiento" muestra la supervivencia de células indicadoras que no experimentaron ningún intercambio de medio. "PBMC UT" muestra la supervivencia de células indicadoras tratadas con medio de PBMC no expuestos. "UT" muestra la supervivencia de células indicadoras tratadas con medio de PBMC expuestos al medio de células no transfectadas. "Sin PBMC" (barras grises) indica la supervivencia cuando se añadía medio acondicionado a medio cultivado de PBMC, pero *en ausencia* de PBMC, y este se usó 48 horas después para exponer las células indicadoras. Este último control se usó para detectar un posible efecto de circunstante directo residual del medio acondicionado después de incubación en medio de PBMC en ausencia de PBMC.

Las figuras **4A-C** muestran la destrucción de células cancerosas *in vitro* mediante PBMC activados. Las células se cultivaron como se describe en los procedimientos. Las células entonces se transfectaron con poliIC/MPPE a 0,1 µg/ml. A las 24 h después, se añadieron 500 000 PBMC/pocillo a las células cancerosas y se incubaron durante otras 24 h. Se visualizaron células apoptóticas (puntos brillantes) usando un kit de anexina-V-biotina (Biosource, Inc.). Para distinguir las células tumorales de los PBMC, las células tumorales se marcaron con anticuerpo contra EGFR conjugado con FITC (Biosource, Inc., células grises). Las células se visualizaron con un microscopio fluorescente y se fotografiaron usando una cámara digital: se muestran células A431, células MDA-MB-468 y células U138MG en las figuras **4A, 4B** y **4C**, respectivamente.

Las figuras **5A-E** muestran el efecto del tratamiento con poliIC/MPPE/PBMC sobre la supervivencia de ratones con tumores diseminados. Los tumores diseminados se establecieron como se describe en los procedimientos. **(5A)** Análisis histopatológico de pulmones de ratón en el momento del inicio del tratamiento (15 días después de la inyección de células). Las flechas indican un tumor en un capilar pulmonar. **(5B, 5C)** A los 15 días después de la inyección de células, los animales se dividieron aleatoriamente en grupos (5 ratones por grupo) y se inició el tratamiento con 4 inyecciones intravenosas consecutivas de 20 µg de poliIC/MPPE a intervalos de 24 h. A las 24 h después de la última inyección de poliIC, a los animales se les inyectó una vez cuatro millones de PBMC. **(5B)** Muestra la supervivencia de los animales con tumores A431. **(5C)** Muestra la supervivencia de los animales con tumores MDA-MB-468. pGlu/MPPE, poli(ácido glutámico)/MPPE; UT, sin tratar. **(5D, 5E)** A los 10 días después de la inyección de células, los animales se dividieron aleatoriamente en grupos (5 ratones por grupo) y el tratamiento se inició con 3 ciclos de 3 o 4 inyecciones intravenosas consecutivas de 20 µg de poliIC/MPPE a intervalos de 24 h (total 10 inyecciones). El intervalo entre los ciclos fue de 48 h. Este procedimiento eliminó los efectos tóxicos del tratamiento como pérdida de peso (datos no mostrados). Los grupos de control incluyeron ratones tratados con pGlu/MPPE (poli(ácido glutámico)/MPPE) para determinar el efecto del conjugado sin poliIC y tampón HBG (glucosa tamponada con Hepes)(2). **(5D)** Muestra la supervivencia de los animales con tumores A431. **(5E)** Muestra la supervivencia de los animales con tumores MDA-MB-468. UT, sin tratar.

La figura **6** representa el efecto de los vectores pIC/MPPE y pIC/PPE sobre la supervivencia de células transfectadas con los mismos. Las células usadas fueron U87MG y MDA-MB468 (4000 células de cada), que expresan diferentes niveles de EGFR (U87MG expresan 1×10^5 EGFR; MDA-MB468 expresan 2×10^6 EGFR) y U138MG (3000 células) que no expresan EGFR. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante una noche. Las células entonces se transfectaron con pIC formulado con el conjugado MP_{25Br}PE o P₂₂₁PE. La supervivencia de las células se analizó mediante ensayo de azul de metileno 48 h después de la transfección. UT, células sin tratar. pGlu, células tratadas con poli(ácido glutámico).

La figura **7** representa el efecto de los vectores pIC/PPE y pIC/PPGE11 sobre la supervivencia de células transfectadas con los mismos. Las células usadas fueron MCF7, MDA-MB231 (MDA231), U87MG, U87MGwtEGFR, y MDA-MB468 (MDA468) (4000 células de cada), que expresan diferentes niveles de EGFR (MDA231 expresan $3-7 \times 10^5$, U87MG expresan 1×10^5 EGFR; MDA468 expresan 2×10^6 EGFR) y U138MG (3000 células) que no expresan EGFR. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante una noche. Las células entonces se transfectaron con pIC formulado con el conjugado P₂₅₁PE o P₂₅₁PGE11. La supervivencia de las células se analizó mediante ensayo de azul de metileno 48 h después de la transfección. UT, células sin tratar.

Las figuras **8A-B** muestran el efecto de diferentes vectores (pGlu/MPPE, pGlu/PPE, pIC/MPPE y pIC/PPE) *in vivo* sobre A431 s.c. cultivadas en ratones atímicos. Para el experimento representado en **8A**, a ratones hembra de 4-5 semanas de edad se les inyectó s.c. 2 millones de células A431 (línea celular de carcinoma epitelial humano que expresa altos niveles de EGFR) disueltas en 200 ml de PBS. Cuando los tumores alcanzaron ~80 mm³, los ratones se dividieron en 5 grupos con 5 animales por grupo. Se inyectaron IV 10 mg de pIC formulado con el conjugado indicado cada 48 h. Para el experimento representado en **8B**, a ratones hembra de 6-7 semanas de edad se les inyectó s.c. 2 millones de células U138MG disueltas en 100 ml de PBS. Cuando los tumores alcanzaron ~75 mm³, los ratones se dividieron en 3 grupos con 9 animales por grupo. A los ratones entonces se les inyectó IV la dosis indicada de pIC/P₂₂₁PE (10 o 25 mg/ratón una vez cada 48 horas). pGlu, poli(ácido glutámico).

Descripción detallada de la invención

- 5 En determinadas realizaciones, la presente invención divulga un vector dirigido a EGFR que comprende una molécula de ARNbc, un agente conocido por su citotoxicidad y capacidad de penetración celular; con un péptido o polipéptido de unión a EGFR que puede dirigir el vector a células tumorales que sobreexpresan EGFR, para su uso en combinación con células inmunitarias para el tratamiento de tumores que sobreexpresan EGFR.
- 10 En otras determinadas realizaciones, la presente invención divulga un procedimiento para el tratamiento de cáncer, caracterizado por células que sobreexpresan EGFR, comprendiendo dicho procedimiento administrar de forma sistémica a un paciente que lo necesita una combinación de: (i) un vector dirigido a EGFR que comprende una molécula de ARNbc con un péptido o polipéptido de unión a EGFR que puede dirigir el vector a células tumorales que sobreexpresan EGFR; y (ii) células inmunitarias.
- 15 La molécula de ARNbc para su uso en la presente invención es una molécula bicatenaria sintética que puede incluir un número diferente, pero preferiblemente el mismo, de ribonucleótidos en cada hebra. Cada hebra de la molécula de ARNbc puede comprender el mismo o diferentes tipos de ribonucleótidos incluyendo inosinato (I), citidilato (C), adenilato (A), guanilato (G) y uridilato (U). En determinadas realizaciones preferidas, cada una de las hebras está compuesta de un solo tipo de ribonucleótidos y, más preferiblemente, los ribonucleótidos de las dos hebras son parejas coincidentes de ribonucleótidos, por ejemplo, parejas de adenilato-uridilato o inosinato-citidilato.
- 20 En determinadas realizaciones preferidas, el ARNbc está completamente compuesto de parejas coincidentes de ribonucleótidos, más preferiblemente parejas de inosinato (I)-citidilato (C). Por tanto, la molécula de ARNbc incluye una hebra de poli(ácido inosínico) y una hebra de poli(ácido citidílico) y en este documento se denomina "poliIC" o "pIC". El poliIC puede estimular la liberación de citocinas citotóxicas y, mediante la inducción de producción de interferón-gamma, puede aumentar el número y las actividades tumorocidas de diversas células inmunohematopoyéticas.
- 25 El poliIC del vector de la invención puede estar compuesto de hebras de ARN que comprenden cada una al menos 22, preferiblemente al menos 85 ribonucleótidos. En determinadas realizaciones, cada hebra tiene un número de ribonucleótidos dentro del intervalo de 100-300.
- 30 El péptido o polipéptido de unión a EGFR que puede dirigir el vector a las células tumorales que sobreexpresan EGFR puede ser un polipéptido, por ejemplo, el propio EGF. En determinadas realizaciones, el péptido de unión a EGFR es un ligando peptídico para EGFR tal como el péptido de 12 monómeros GE11 de la secuencia YHWYGYTPQNVl aislado de una colección de fagos, sintetizado y cultivado para que se una a EGFR de forma competitiva con EGF (Li *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2008).
- 35 El ARNbc está preferiblemente asociado no covalentemente al resto de dirección del vector. Esto facilita la disociación del ARNbc del resto de dirección después de llegar a la célula/tejido diana y su internalización en la célula/tejido tumoral causando la producción de quimiocinas que atraerán a las células inmunitarias al sitio del tumor.
- 40 La asociación no covalente del poliIC con la molécula de dirección se logra preferiblemente mediante un vehículo de ácido nucleico que está asociado tanto con la molécula de ARNbc como con el resto de dirección.
- 45 El vehículo de ácido nucleico puede comprender un polímero policatiónico y/o un polímero soluble en agua no iónico.
- 50 Los polímeros policatiónicos que pueden usarse como vehículos de ácido nucleico incluyen poli-L-lisina o, preferiblemente, polietilénimina (PEI). PEI es un polímero policatiónico con la capacidad de asociarse no covalentemente con moléculas de ARN bicatenario debido a la naturaleza polianiónica de las últimas, neutralizando de ese modo las cargas electrostáticas negativas de la molécula de ARNbc, y contrarrestando, por tanto, cualquier tendencia del ARNbc a interactuar químicamente con moléculas aniónicas. El uso de polietilénimina en la transfección de células con polinucleótidos es bien conocido en la técnica; sin embargo, en su uso tradicional, la polietilénimina transporta el ARNbc a la membrana celular, se adhiere a la misma, experimenta captación endosómica y posterior suministro citoplasmático del ARNbc tras la degradación de la membrana endosómica. Por
- 55 el contrario, en la presente invención, la dirección y unión del ARNbc al receptor de EGFR en la superficie de la célula cancerosas es la vía principal para la internalización del ARNbc.
- 60 El polímero soluble en agua no iónico para su uso como vehículo de ácido nucleico en la presente invención es preferiblemente polietilenglicol (PEG), que es biocompatible, biológicamente inerte y se usa ampliamente para transportar fármacos *in vivo*.
- 65 En determinadas realizaciones preferidas, el vehículo de ARNbc usado en la invención comprende tanto polietilénimina (PEI) como polietilenglicol (PEG), que está unido covalentemente al PEI. El PEG confiere excelente solubilidad en agua y distribución tisular al complejo y aumenta su semivida en suero.

5 El PEI puede estar ramificado o ser lineal y tiene un peso molecular seleccionado de aproximadamente 1-25 kDa, aproximadamente 5-23 kDa, aproximadamente 15-25 kDa, y el PEG tiene un peso molecular seleccionado de aproximadamente 0,3-50 kDa, aproximadamente 1-20 kDa, aproximadamente 3-10 kDa. En determinadas realizaciones, el vehículo de ARNbc comprende PEI ramificado de 25 kDa. En determinadas realizaciones preferidas, el vehículo de ARNbc está compuesto de PEI lineal de 22 kDa unido covalentemente a PEG de 3, 4 kDa.

10 El resto de dirección del vector, concretamente, el péptido o polipéptido de unión a EGFR preferiblemente está acoplado covalentemente al resto de PEG del conjugado de PEI-PEG, mientras que el poliIC está asociado no covalentemente con el resto de PEI, por ejemplo, mediante asociación iónica.

15 En determinadas realizaciones, el vehículo de ácido nucleico puede comprender además un compuesto que puede facilitar la degradación de una membrana endosómica, facilitando, por tanto, la liberación de la molécula de ARNbc de un endosoma de célula/tejido diana en el citoplasma, donde el ARNbc media de forma óptima la citotoxicidad. En determinadas realizaciones, este compuesto es melitina o un derivado de melitina, que preferiblemente está asociado covalentemente con el polietilimina del vehículo de ARNbc.

20 Ejemplos de vectores dirigidos a EGFR que pueden usarse de acuerdo con la invención incluyen, sin limitación, los vectores denominados en este documento pIC/MPPE (que comprenden poliIC/PEI de 25 kDa ramificado con melitina-PEG-mEGF, descrito en Shir *et al.*, 2006 y el documento WO 04/045491) y los vectores novedosos pIC/PPE (que comprenden poliIC/PEI de 22 kDa lineal-PEG-mEGF) y pIC/PPGE11 (que comprende poliIC/PEI de 22 kDa lineal-PEG-péptido GE11).

25 Por tanto, en determinadas realizaciones, la presente invención proporciona los vectores novedosos dirigidos a EGFR pIC/PPE y pIC/PPGE11, en este documento caracterizados como vectores de segunda generación (frente a los vectores de primera generación tales como pIC/MPPE descritos en el documento WO 04/045491).

30 Los vectores de segunda generación no comprenden melitina y comprende PEI lineal en lugar de PEI ramificado. Además, en uno de los vectores de segunda generación, el EGF de ratón recombinante (mEGF) se reemplazó con el péptido de 12 monómeros GE11. Además de la simplificación del procedimiento de preparación de los vectores de segunda generación en comparación con la primera generación, los autores de la presente invención también han descubierto que la sustitución del PEI ramificado con el PEI lineal producía mayor eficacia en la destrucción de células cancerosas. Esto es bastante sorprendente ya que, en los vectores de segunda generación, hay solamente una molécula de EGF en cada molécula de PEI línea frente a los varios EGF en el PEI ramificado de los vectores de primera generación y podría esperarse una afinidad inferior por EGFR para los vectores de segunda generación.

35 Para que un tumor llegue a establecerse, debe evitarse la eliminación por el sistema inmunitario. Muchos cánceres desarrollan mecanismos de inhibición de la inmunovigilancia y puede crecer incluso en presencia de linfocitos inmunitarios que reconocen antígenos cancerosos. Los mecanismos de esta inhibición local no están claros, aunque se han examinado muchas teorías. El poliIC, un adyuvante potente e interferón, un inmunoadyuvante fuerte, puede superar bien esta inhibición local y activar los linfocitos inmunitarios específicos de cáncer preexistente, además de atraer y activar otras células inmunitarias.

40 Se ha demostrado previamente (Shir *et al.*, 2006) que las células cancerosas transfectadas con poliIC dirigido a EGFR secretan las citocinas Gro- α (oncogén alfa regulado por el crecimiento) e IP-10, que se sabe que pueden atraer células inmunitarias. No estaba claro, sin embargo, si estas citocinas se secretaban en cantidades suficientes para causar realmente que las células inmunitarias se acumularan en el sitio de las células cancerosas.

45 Se ha descubierto, de acuerdo con la presente invención, que estas citocinas, inducidas por poliIC dirigido, atraen las células inmunitarias al tumor transfectado y potencian fuertemente la eficacia con que se destruyen las células cancerosas. Esto induce un efecto sinérgico importante, que da lugar a la eliminación completa de tumores diseminados, incluso cuando se tratan desde una distancia con una dosis total baja de poliIC dirigido a EGFR (véase el ejemplo 6). Las células inmunitarias activadas potencian fuertemente el efecto de circunstancia conseguido por IFN- α (véase el ejemplo 4), que debe facilitar la destrucción de cánceres heterogéneos. Como poliIC/MPPE se dirige selectivamente a células cancerosas, no se espera que se produzcan reacciones inmunotóxicas sistémicas importantes. El hecho de que los PBMC humanos inyectados en ratones no indujeran ninguna reacción de injerto contra hospedador, mientras se inducía una reacción antitumoral fuerte, apoya esta suposición.

50 Como se menciona anteriormente en este documento, la administración intratumoral o peritumoral de poliIC no dirigido ha demostrado ser eficaz en inmunoterapia antitumoral (Fujimura *et al.*, 2006). Dicho tratamiento está limitado a tumores localizados únicamente. Por el contrario, el poliIC dirigido a EGFR es eficaz en el tratamiento de tumores diseminados que son imposibles de tratar por tratamiento local.

55 El poliIC dirigido a EGFR, por tanto, puede combinarse con varias inmunoterapias contra el cáncer como se muestra por la presente invención. Estas inmunoterapias contra el cáncer incluyen vacunas contra el cáncer y linfocitos T dirigidos al cáncer (genomanipulados o extraídos). Para mediar los efectos antitumorales *in vivo*, los linfocitos T

dirigidos al cáncer deben viajar al sitio del tumor, extravasar desde la circulación y, después, mediar las funciones efectoras para causar la destrucción de las células cancerosas (Rosenberg, 2008). IP-10 y Gro-alfa inducidas fuertemente por poliIC dirigido selectivamente en células tumorales (tablas 2, 3) deben facilitar tanto el tránsito al tumor como la extravasación, mientras que el interferón debe potenciar la destrucción del cáncer mediada por linfocitos T.

Además, el trasplante de células inmunitarias alogénicas para activar las reacciones de injerto contra hospedador (Ciceri *et al.*, 2007) puede combinarse con los vectores dirigidos a EGFR de la presente invención como se muestra en este documento. La inyección de PBMC exógenos en ratones tratados con poliIC/MPPE como se divulga en este documento (figuras 5B, C) realmente se parece a dicha combinación. Las células inmunitarias injertadas deben conferir un efecto antitumoral más fuerte que las propias células inmunitarias del paciente.

Ejemplos de células inmunitarias para su uso en combinación con el vector dirigido a EGFR como se divulga en este documento son linfocitos T de infiltración tumoral (TIL), linfocitos T genomanipulados específicos de tumor, o leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC). Los linfocitos T genomanipulados son células que se han reprogramado genéticamente o "redirigido" para que expresen receptor de linfocitos T reactivo al tumor (TCR) o moléculas de TCR quiméricas que presentan capacidad de reconocimiento tumoral de tipo anticuerpo conocidos como "T-cuerpo". La estrategia de T-cuerpo combina el reconocimiento de los anticuerpos y la función efectora de los linfocitos T. Se basa en linfocitos T que expresan receptores quiméricos compuestos de Fv derivado de anticuerpo o scFv como elementos de reconocimiento extracelulares unidos a moléculas activadoras de linfocitos. A diferencia de los anticuerpos, los linfocitos T son muy adecuados para penetrar y destruir los tumores sólidos.

Las células inmunitarias pueden administrarse simultáneamente con el vector, pero preferiblemente el vector y las células inmunitarias se administran secuencialmente. En determinadas realizaciones preferidas, el vector se administra de forma sistémica en primer lugar, seguido de la administración de las células inmunitarias a un intervalo deseado. De forma importante, el vector y las células inmunitarias muestran sinergia en la destrucción de las células de un tumor.

En vista de los resultados experimentales obtenidos en ratones con el vector de la presente invención en combinación con PBMC, esta politerapia puede ser beneficiosa y dar lugar a una cura completa en pacientes con cáncer con un sistema inmunitario funcional.

Por tanto, aquí se demuestra, por primera vez, una estrategia para erradicar tumores que sobreexpresan EGFR diseminados en ratones SCID, cuyo sistema inmunitario se ha reconstituido con linfocitos humanos en la sangre periférica (PBMC). El suministro intravenoso de melitina-polietilenoimina-polietilenglicol-EGF (poliIC/MPPE) durante 4 días, seguido en el 5.º día de una inyección intraperitoneal de 4 millones de PBMC, indujo la cura completa de ratones SCID-NOD con tumores que sobreexpresan EGFR diseminados preestablecidos, sin efectos secundarios adversos. Las células inmunitarias y las citocinas que producen están localizadas en el sitio del tumor del animal tratado. Doce meses después de cesar el tratamiento, los ratones tratados permanecen sin cáncer y sanos. Aquí se demuestra además que el sistema inmunitario migra al sitio de los tumores, debido a las quimiocinas producidas por el poliIC internalizado, lo que indica que un vector dirigido a EGFR cargado con poliIC puede movilizar el sistema inmunitario para tratar y posiblemente curar a pacientes con tumores que sobreexpresan EGFR diseminados.

La combinación de vector dirigido a EGFR/células inmunitarias como se divulga en este documento puede usarse en el tratamiento de cáncer, caracterizado por expresión de EGFR. El término "expresión", como se usa en este documento debe entenderse incluyendo también el término "sobreexpresión", que por su naturaleza es un término relativo a menudo evaluado en la técnica midiendo la amplificación génica relativa o el número de receptores presentes en una célula cancerosa en comparación con el número de receptores presentes en una célula normal, por ejemplo, como se muestra en la **tabla 1**. Por tanto, la sobreexpresión puede definirse como un amplificación doble o mayor del gen *EGFR*, que se determina por hibridación fluorescente *in situ* (FISH), o como una tinción positiva (1+, 2+ o 3+) usando anticuerpos anti-EGFR en un ensayo de inmunohistoquímica (IHC). Otros criterios usados en la técnica para determinar la sobreexpresión es la fracción de membrana celular marcada con un anticuerpo específico; por tanto, la sobreexpresión de EGFR puede definirse como al menos un 1 % de tinción membranosa e intensidad 1+, o al menos un 10 % de tinción membranosa. Además, las células pueden clasificarse como células que no expresan, o tienen niveles indetectables de EGFR, células que expresan niveles bajos de EGFR (de aproximadamente 1000 a aproximadamente 10 000 receptores/célula), niveles medios de EGFR (de aproximadamente 10 000 a aproximadamente 100 000 receptores/célula) y células que expresan niveles altos de EGFR (de aproximadamente 1×10^5 o más receptores/célula). Por lo tanto, el cáncer susceptible a tratamiento usando las combinaciones de la presente invención son cánceres caracterizados por amplificación doble o mayor del gen *EGFR*, ensayo IHC positivo (1+, 2+, o 3+), al menos un 1 %, o al menos un 10 % de tinción membranosa, niveles medios de EGFR y preferiblemente células cancerosas caracterizadas por niveles altos de EGFR.

La expresión "tratar el cáncer", como se usa en este documento, se refiere a la inhibición del crecimiento de células cancerosas. Preferiblemente, dicho tratamiento también da lugar a la regresión del crecimiento del tumor, es decir, a la disminución en el tamaño o la regresión completa del tumor. En realizaciones preferidas, el término se refiere a tratamiento y alivio o cura completa de tumores diseminados, concretamente, de metástasis.

Los términos "tumor" y "cáncer" se usan en este documento indistintamente. En particular, la combinación de la presente invención es útil en el tratamiento de un cáncer que sobreexpresa EGFR, seleccionado de carcinoma broncopulmonar no microcítico, cáncer de mama, glioblastoma, carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, adenocarcinoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga y cáncer de próstata, y metástasis de los mismos.

Tabla 1. Predominio de sobreexpresión/amplificación de HER1/EGFR en diversos estudios clínicos.

Fuente	N	Definición de sobreexpresión de HER1/EGFR o amplificación de EGFR	Porcentaje de tumores con sobreexpresión de HER1/EGFR o amplificación de EGFR
Dancer <i>et al.</i> , 2007, <i>Oncol. Rep.</i> , 18: 151-55	32	Amplificación doble o mayor del gen <i>EGFR</i> por FISH	65 %
Bloomston <i>et al.</i> , 2006, <i>Dig. Surg.</i> 23:74-9	71	Tinción 1+ o mayor por IHC	69 %
Thybusch-Bernhardt <i>et al.</i> , 2001, <i>J Surg Investig</i> 2: 393-400	24	Tinción positiva por IHC	33 %
Onn <i>et al.</i> , 2004, <i>Clin Cancer Res</i> 10: 136-143	111	Tinción 2 o 3 por IHC	60 %
Rusch <i>et al.</i> , 1993, <i>Cancer Res</i> 53: 2379-85	44	Detección aumentada por análisis de Northern	45 %
Seivaggi <i>et al.</i> , 2004, <i>Ann Oncol</i> 15:28-32	48	Tinción 2+ o 3+ por IHC	37 %
Ohtsuka <i>et al.</i> , 2006, 1: 787-795	48	Tinción 2+ o 3+ por transferencia de Western	40 %

En nuestra divulgación previa con los vectores de primera generación (Shir *et al.*, 2006), hemos mostrado la erradicación satisfactoria de tumores localizados mediante inyección intratumoral de vectores de poliIC dirigidos a EGFR. Esto no mostró que sería posible tratar tumores diseminados mediante administración sistémica de los vectores, porque no estaba claro en absoluto si una cantidad terapéuticamente eficaz de vector alcanzaría los tumores.

Ahora hemos descubierto y mostrado aquí por primera vez en los ejemplos a continuación que la administración sistémica de poliIC dirigido a EGFR es eficaz en erradicar tumores incluso a concentraciones sorprendentemente bajas (tan bajas como 10 ng/ml de pIC), que un experto en la materia no habría esperado que fuera suficientemente alta para acumularse en el tumor en niveles terapéuticamente eficaces. Además, otra ventaja es que el poliIC dirigido a EGFR afecta únicamente a células cancerosas, dejando las células normales sin dañar.

Como divulgamos previamente, el vector de poliIC dirigido a EGFR ejerce un fuerte efecto de circunstante, es decir, destruye las células que sobreexpresan EGFR, así como las células tumorales adyacentes, expresen o no EGFR o su versión mutada EGFR^{III}. Se mostró que las células que sobreexpresan EGFR transfectadas con poliIC dirigido a EGFR secretan la citocina antiproliferativa IFN- α que probablemente causaba al menos parte del efecto de circunstante. Esto es crucial, porque incluso tumores que muestran fuerte sobreexpresión de EGFR habitualmente son heterogéneos con respecto a la expresión de EGFR. Al mismo tiempo, el poliIC dirigido a EGFR es muy selectivo de células tumorales, con efectos tóxicos mínimos sobre los tejidos normales circundantes, así como sobre tejidos normales distantes. El poliIC dirigido activa rápidamente múltiples rutas antiproliferativas/proapoptóticas, minimizando la probabilidad de mutaciones que den lugar a resistencia a fármacos.

Por tanto, en determinadas realizaciones, los vectores dirigidos a EGFR divulgados en este documento (tanto los vectores de primera como los de segunda generación) están destinados a administración sistémica.

La presente invención, por tanto, proporciona además una composición farmacéutica para administración sistémica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un vector dirigido a EGFR que comprende una molécula de ARNbc bicatenaria con un polipéptido de unión a EGFR.

La presente invención también proporciona además un procedimiento para el tratamiento de cáncer, caracterizado por células que sobreexpresan EGFR, comprendiendo dicho procedimiento administrar de forma sistémica a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de un vector dirigido a EGFR que comprende una molécula de ARNbc bicatenaria con un polipéptido de unión a EGFR.

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de cáncer, caracterizado por sobreexpresión de EGFR mediante movilización del sistema inmunitario, que comprende administrar de forma sistémica a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector dirigido a EGFR que comprende una molécula de ARNbc bicatenaria con un polipéptido de unión a EGFR, generando, por tanto, citocinas que atraen células inmunitarias a los sitios de tumor y causando potenciación de la eficacia de destrucción de células tumorales.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares. Pueden encontrarse técnicas para formulación y administración de fármacos, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan para administración sistémica por cualquier vía adecuada, por ejemplo, para suministro parenteral incluyendo inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea, intratecal o intraperitoneal.

Para cualquier composición usada en el procedimiento de la invención, la cantidad terapéuticamente eficaz o dosis puede estimarse inicialmente de ensayos *in vitro* y de cultivo celular. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir una concentración o valor deseado. Dicha información puede usarse para determinar de forma más precisa dosis útiles en seres humanos. Como se muestra a continuación en los ejemplos, una dosis de 5 µg de vector/ratones/día fue suficiente para erradicar los tumores preestablecidos en ratones. Una dosis equivalente aproximada esperada para su administración a un ser humano puede calcularse usando fórmulas conocidas en 20 µg/kg o 1,2 mg/día para un adulto de 60 kg y 2,0 mg/día para un adulto de 100 kg. Por tanto, la dosis para administración sistémica en un ser humano debe estar en el intervalo de 0,1 mg/día a 20 mg/día.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

En los ejemplos a continuación, los vectores se describen en forma abreviada.

Materiales y procedimientos

(i) Reactivos y ensayos. El poliiC se obtuvo de Sigma (Rehovot, Israel). El peso molecular puede variar de un lote a otro con un intervalo de 90 000 a 1 400 000 con un promedio de 200 000 a 500 000. Como un par de bases tiene el PM de 680 Da, 90 000 Da = 133 pb; 1 400 000 Da = 2059 pb; 200 000 Da = 294 pb; y 500 000 Da = 735 pb (información de PM tomada del sitio web de Sigma). Se disolvió en H₂O doblemente destilada tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC). La polietilenimina (PEI), PEI₂₅, 3-(2-piridilditio) propionato de succinimidilo (SPDP) y ramificado se adquirieron de Sigma-Aldrich (Múnich, Alemania). El NHS-PEG-MAL (PM ¼ 3400) se obtuvo de Nektar Therapeutics (Huntsville, Alabama, EE. UU.) y el EGF de ratón recombinante (mEGF) de Pepro Tech EC Ltd. (Londres, RU). El contenido de PEI del conjugado se determinó espectrofotométricamente por ensayo de TNBS a 405 nm. La cantidad de conectores de ditiopiridina en PEI se determinó después de reducción de una alícuota con ditiotreitolo (DTT) seguida de medición de la absorción de piridina-2-tiona liberada a 343 nm. La relación molar de mEGF:ditiopiridina se determinó espectrofotométricamente a 280 y 340 nm. La cantidad de ditiopiridina se determinó como se describe [6,7]. El rendimiento de mEGF (mg) se calculó en dos ecuaciones. Ecuación 1: $A_{280}(a) = A_{340}$ con DTT x 5,1/8,1. Ecuación 2: A_{280} revisada = $A_{280} - A_{280}(a)$. El resultado de la ecuación 2 fue la cantidad de mEGF en mg. Se usó el ensayo de Ellman para la determinación de los grupos mercapto en mEGF-SH. Se realizó cromatografía de líquidos de los conjugados con el sistema básico AKTA de Amersham Biosciences (Little Chalfont, EU). Se adquirió melitina (Mel) (D-Mel-SH; e280 ¼ 5570, PM ¼ 2893,6) de IRIS Biotech GmbH (Marktredwitz, Alemania). Todos los demás agentes químicos, incluyendo PEI lineal, se adquirieron de Sigma-Aldrich.

Componentes del complejo de pIC:vehículo: El ARNbc en forma de un complejo de poli(ácido inosínico)-poli(ácido citidílico) (pIC) sintético que tiene hebras de ARN de 100-300 ribonucleótidos de longitud se obtuvo de Pharmacia-Amersham. Para la preparación de los vectores, el poliiC se mezcla con el conjugado MPPE, PPE o PEGE11 descrito en este documento. El reactivo de transfección FuGENE6 se obtuvo de Roche. Los vehículos de ARNbc de polietilenimina (PEI)₂₅-polietilenglicol (PEG)-factor de crecimiento epidérmico (EGF) y PEH-melitina (MEL) conjugados covalentemente se sintetizaron como se describe a continuación.

Preparación de vehículo de PEI₂₅-PEG-EGF (PPE) conjugado covalentemente

Se proporcionan directrices generales para preparar vehículo de PEI₂₅-PEG-EGF conjugado covalentemente en Current Protocols In Human Genetics, Complemento 11, Capítulo: Vectors for Gene Therapy, 12.3.17; 12.3.18, John Wiley & Sons, Inc., 1996.

Reactivos: Se adquirió PEI ramificado de PM promedio de 25 kDa determinado mediante dispersión de luz (PEhs) y SPDP de Sigma-Aldrich (Múnich, Alemania). Se obtuvo *N*-hidroxisuccinimidil polietilenglicol maleimida (NHS-PEG-MAL, PM = 0,4 kDa) de Nektar Therapeutics. El compuesto NHS-PEG-MAL se usa para conjugar restos que tienen un grupo reactivo adecuado con PEG. Se adquirió EGF de ratón recombinante de Pepro Tech EC Ltd. (Londres, RU).

Cromatografía de líquidos: La cromatografía de líquidos se realizó usando una bomba Waters 626 y un detector de

serie de diodos 996.

Cuantificación de PEI: El contenido de PEI de los conjugados se determinó espectrofotométricamente mediante ensayo de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS) a 405 nm como se describe previamente (Snyder y Sobocinski, 1975. Anal. Biochem. 64, 284-288).

Determinación de la cantidad de conectores de ditiopiridina: La cantidad de conectores de ditiopiridina que podían generarse en PEI₂₅ para las conjugaciones se determinó después de reducción de una alícuota con ditioneitol (DTT) seguida de medición de la absorción de piridina-2-tiona liberada a 343 nm ($\epsilon = 80801M$ cm).

Cuantificación de grupos maleinimida reactivos en NHS-PEG-MAL: La cantidad de grupos maleinimida reactivos en NHS-PEG-MAL se calculó espectrofotométricamente como una función de la absorbancia a 300 nm (A₃₀₀). Una solución de 1 mg/ml de NHS-PEG-MAL en agua tiene una DO₃₀₀ de 0,15 para una longitud de trayectoria de 1 cm. La cantidad de grupos maleinimida reactivos en el conjugado de PEI₂₅-PEG-MAL se calculó de forma similar por la diferencia en A₃₀₀ antes y después de la adición de 10 microlitros de solución de DTT 1 molar a 100 microlitros de la muestra (la adición de DTT elimina la A₃₀₀ del grupo maleinimida por deslocalización de electrones).

Cuantificación de la concentración de EGF: La concentración de EGF recombinante soluble se calculó midiendo la absorción de EGF en solución a 280 nm: una solución de 1 mg/ml de EGF en agua produce una DO de 3,1 (1 cm de longitud de trayectoria). La relación molar de EGF y ditiopiridina en un conjugado de EGF-PDP se determinó espectrofotométricamente a 280 y 340 nm. Para la cantidad de absorción de ditiopiridina se mide a 340 nm (véase anteriormente). La absorción inicial del conjugado se mide a 280 nm (A₂₈₀); para corregir la absorción de ditiopiridina a 280 nm, este valor se corrige mediante las siguientes ecuaciones.

$$\text{Ecuación 1: } A_{280} a = A_{340} \text{ con DTT} \times 5,1/8,1.$$

$$\text{Ecuación 2: } A_{280} \text{ revisada} = A_{280} - A_{280} a.$$

El resultado de la ecuación 2 se usa para calcular la concentración final de EGF. Se usa un ensayo de Ellman para la determinación de los grupos mercapto en EGF-SH.

Síntesis de PEI₂₅-PEG-MAL: Una alícuota de 1,6 micromoles de PEI₂₅ obtenido por filtración en gel (Sephadex G-25, superfino; Amersham Biosciences) disuelta en NaCl 0,25 M se ajustó a pH 4,4 mediante la adición cuidadosa de HCl. Se añadió una alícuota de 6,4 micromoles de NHS-PEG-MAL disuelto en 0,4 ml de agua, y después de 1 hora de reacción a temperatura ambiente, la concentración salina se ajustó a NaCl 1 M. Esta mezcla se cargó en una columna de intercambio catiónico (Macro-prep High S; 10/10; BioRad, Múnich, Alemania) y se fraccionó usando un gradiente salino de NaCl 1-3 M en acetato de sodio 20 mM, pH 4,5 con un caudal de 0,5 ml/minuto. El fraccionamiento se realizó usando tampón A (acetato de sodio 20 mM pH 4,5) y tampón B (NaCl 3 M, acetato de sodio 20 mM pH 4,5), de la siguiente manera: tiempo = 0-15 minutos: tampón A al 56 %, tampón B al 44 %; tiempo = 15-20 minutos: tampón A al 44-100 %; tiempo = 20-60 minutos: tampón B al 100 %. El detector se ajustó a 240 y 300 nm, y el producto se eluyó a tiempo = 40-50 minutos. La relación molar ratio de PEI₂₅ y grupos maleinimida reactivos fue de 1:1,6.

Síntesis de EGF-PDP: Una alícuota de 5 mg de EGF (PM = 6 kDa) se dializó durante una noche frente a HEPES 20 mM pH 7,1 (desgasificado con argón). Se mezcló una alícuota de 0,5 micromoles de EGF y una alícuota de 5 micromoles de SPDP de una solución madre 10 mM en etanol al 100 %. La concentración de etanol en la mezcla fue de aproximadamente un 33 % (v/v). Después de 3 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se cargó en una columna de filtración en gel (G-10; columna 5 HR10/30, Amersham Biosciences, Alemania; HEPES 20 mM, pH 7,1 con etanol al 20 %). El producto (4 ml), detectado a 300 nm, eluyó a tiempo = 18-26 min. El rendimiento fue de 3,36 mg para EGF modificado con 0,77 micromoles de ditiopiridina.

Síntesis de EGF-SH: Una alícuota 0,56 micromolar de EGF se mezcló con 50 equivalentes de DTT en 100 microlitros de agua. Después de 5 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se cargó en una columna de filtración en gel (G-10; columna HR10/30, Amersham Biosciences, Alemania; HEPES 20 mM, pH 7,1 con etanol al 20 %). El producto (5,5 ml), detectado a 280 nm, se eluyó a tiempo = 17-28 minutos. La relación molar de EGF a grupos -SH fue de 1:1,82.

Síntesis de PEI₂₅-PEG-EGF (PPE): Una alícuota 0,28 micromolar de EGF que contenía 0,51 micromoles de grupos tiol se mezcló en atmósfera de argón con PEI₂₅-PEG-MAL que contenía 0,51 micromoles de grupos maleinimida reactivos. El pH final de la mezcla de reacción fue 6, y la concentración salina final fue NaCl 0,3 M. Después de una incubación de 26 horas a temperatura ambiente, la concentración salina de la mezcla de reacción se ajustó a 0,5 M con NaCl 3 M, la mezcla de reacción se cargó en una columna de intercambio catiónico (Macro-prep High S; 1011 0; BioRad, Múnich, Alemania) y se fraccionó con un gradiente salino de NaCl 0,5-3 M en HEPES 20 mM, pH 7,1 usando un caudal de 0,5 ml/minuto y el detector ajustado a 280 nm. El fraccionamiento se realizó usando tampón A (HEPES 20 mM pH 7,1) y tampón B (HEPES 20 mM pH 7,1, NaCl 3 M), de la siguiente manera: tiempo = 0-20 minutos: tampón A al 78 %, tampón B al 22 %; tiempo = 20-80 minutos: tampón B al 22-100 %; tiempo = 80-90

minutos: tampón B al 100 %. El conjugado se eluyó a NaCl 2,4-3 M (10 ml combinado). Las fracciones (tiempo = 10-28 minutos, producto B) en la parte isocráticamente también se combinaron (9 ml). El producto se dializó durante una noche a 4 °C frente a tampón HBS (HEPES 20 mM pH 7,1, NaCl 150 mM), pH 7,3 (desgasificado con argón). La cantidad de EGF en el conjugado (0,65 mg) y en el producto B (0,98 mg) se determinó espectrofotométricamente a 280 nm. La concentración de PEI25 en el conjugado (136 nmol) y en el producto B (38 nmol) se determinó espectrofotométricamente por ensayo de TNBS a 405 nm. La relación molar de EGF a PEI25 en el conjugado fue de 0,8:1.

Síntesis de Mel-PEI₂₅-PEG-mEGF. Se mezcló mEGF-PEG-PEI₂₅ (83 nmol de PEI) con SPDP (664 nmol en etanol al 100 %) en atmósfera de argón. Después de 3 h a temperatura ambiente, la mezcla de aproximadamente 2 ml se cargó en una columna de filtración en gel (Sephadex G25 superfino; HR10/30; HEPES 20 mM [pH 7,1], NaCl 0,5 M; Amersham Biosciences). El conjugado funcionalizado con PDP (piridilditiopropionilo) purificado (5 ml) que contenía 309 nmol de PDP se concentró hasta 1,5 ml mediante alto vacío. Para la reacción con melitina (Mel), se pesaron 464 nmol de Mel y se disolvieron en 0,5 ml de NaCl 0,5 M, HEPES 100 mM [pH 7,4] desgasificado con argón. Ambos componentes se mezclaron en atmósfera de argón. Después de 20 h a temperatura ambiente el mEGF-PEG-PEI₂₅-Mel se purificó por filtración en gel. Para filtrar en gel el conjugado, se usó una columna Superdex 75 de calidad preparativa 10/30, acondicionada con PEI25 (10 mg de PEI25/60 ml de material de gel). Después de diálisis durante una noche (PCPM 14000; Visking tipo 27/32; Roth, Karlsruhe, Alemania) frente a HBS, se obtuvieron 6 ml de conjugado mEGF-PEG-PEI₂₅-Mel (MPPE); estos contenían 66 nmol de PEI (1,64 mg), 350 nmol de Mel y 70 nmol de EGF.

Células: Células A431 (ATCC® n.º CRL-1555™), MDA-MB-468 (ATCC® n.º HTB-132™), U-138 MG (ATCC® n.º HTB-16™), MCF7, MDA-MB-231 (ATCC® n.º HTB-26™), U87MG (ATCC® n.º HTB-14™) y U87MGwtEGFR.

Extracción de PBMC. Los PBMC de donadores humanos sanos se separaron en Ficoll Plaque (Pharmacia), se lavaron dos veces con 50 ml de medio RPMI 1640, se resuspendieron a una densidad de 4×10^6 /ml y se cultivaron en este medio complementado con suero bovino fetal al 10 %, 100 unidades/ml penicilina, 100 mg/ml de estreptomina.

Mediciones de citocinas: Gro- α , IP-10, IFN- β , IFN- γ , IL-2, TNF- α se midieron usando ELISA específico de citocinas (Biosource, Inc).

Expresión de citocinas en tumores y sangre. Las células se inyectaron s.c. en el flanco derecho (A431 o MDA-MB-468) e izquierdo (U138MG) de ratones SCID/NOD. A los 17 días después, cuando los tumores alcanzaron aprox. 100 mm³, se inició el tratamiento de la siguiente manera: 3 inyecciones I.V. consecutivas de poliIC/MPPE de 5 μ g/ratón/día. A las 24 h después de la última inyección de poliIC/MPPE, se inyectaron I.P. 4 millones de PBMC recientes. A las 48 h después, los tumores se extrajeron, se homogeneizaron con 1,5 ml de tampón de extracción (que contenía Tris 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1 %) por gramo de tejido, usando un homogeneizador. Los homogeneizados se centrifugaron a 13 000 x g durante 10 minutos a 4 °C, se almacenaron a -70 °C, después se sometieron a ELISA. Los ELISA también se realizaron sobre muestras de sangre recogidas 24 h después de la última inyección de poliIC/MPPE ("sangre 3d") y 48 h después de la inyección de PBMC ("sangre"). Los números muestran los pg de citocina por 1 gramo de tejido (1 ml de sangre = 1 g)

Efecto de circunstante mediado por PBMC. Se sembraron 100 000 células MDA-MB-468 o células A431 en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante una noche con 2 ml de medio por pocillo (2). Las células entonces se transfectaron con poliIC/MPPE, hasta una concentración final de 0,1 o 0,5 mg/ml. A las 48 h después de la transfección, se añadieron 0,5 ml de medio de las células transfectadas ("medio acondicionado") a 500 000 PBMC que se habían sembrado 24 h antes en placas de 24 pocillos y cultivado en 0,5 ml de medio. Entonces se intercambié 0,1 ml del medio de los PBMC expuestos en el lugar de 0,1 ml de medio de células MDA-MB-468 y células U138MG no transfectadas adicionales ("células indicadoras") sembradas en placas de 96 pocillos 24 h antes. La supervivencia de estas células se determinó mediante ensayo de azul de metileno (2), 48 horas después de la exposición al medio de los PBMC.

En paralelo, para mostrar el efecto de circunstante directo, se usó 0,1 ml de medio acondicionado para reemplazar 0,1 ml de medio de células indicadoras no transfectadas sembradas 24 h antes en placas de 96 pocillos y cultivadas en 0,2 ml de medio. La supervivencia de estas células se determinó 48 horas después de la adición del medio acondicionado usando azul de metileno.

Destrucción de células cancerosas in vitro mediante PBMC activados. Se sembraron 20 000 células A431, 30 000 MDA-MB-468 o 20 000 U138MG en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante una noche en 1 ml de medio RPMI complementado con FCS al 10 % y antibióticos. Las células entonces se transfectaron con poliIC/MPPE a 0,1 mg/ml. A las 24 h después, se añadieron 500 000 PBMC/pocillo a las células cancerosas y se incubaron durante otras 24 h. Las células apoptóticas (fluorescencia roja) se visualizaron usando un kit de anexina-V-biotina (Biosource, Inc.). Para distinguir las células tumorales de los PBMC, las células tumorales se marcaron con anticuerpo contra EGFR conjugado con FITC (Biosource, Inc., fluorescencia verde). Las células se visualizaron con un microscopio fluorescente y se fotografiaron usando una cámara digital.

Efecto del tratamiento con poliIC/MPPE/PBMC sobre la supervivencia de ratones con tumores diseminados.

A ratones SCID-NOD hembra (Harlan), se les inyectó IV 1 millón de células A431 o MDA-MB-468 suspendidas en 200 ml de PBS. A los 10 o 15 días después, los animales se dividieron aleatoriamente en grupos (5 ratones por grupo) y se inició el tratamiento con una serie de inyecciones intravenosas de 20 µg de poliIC/MPPE. A las 24 h después de la última inyección de poliIC, a los animales se les inyectó una vez cuatro millones de PBMC.

Ejemplo 1. poliIC/MPPE induce expresión de citocinas inmunoactivas en células A431 y MDA-MB-468.

En nuestro estudio previo (2) mostramos que una dosis baja de poliIC dirigido a EGFR inducía expresión de IFN-α, IP-10 y Gro-α en células de glioblastoma que sobreexpresan EGFR (U87MGwtEGFR), pero no en células con niveles bajos de EGFR (U87MG). Estos datos respaldan la noción de que las células producen estas citocinas únicamente cuando se ha internalizado un nivel umbral de ARNbc, y que esta dosis se consigue únicamente en células que sobreexpresan EGFR. En este estudio, ampliamos el análisis a dos líneas de células cancerosas adicionales que sobreexpresan EGFR: A431 (carcinoma vulvar) y MDA-MB-468 (carcinoma de mama). Cuando estas células se transfectaban con poliIC/MPPE (2,5 µg/ml), se detectaban hasta 5,1 pg/ml de IFN-β; 148 pg/ml de Gro-α y 188 pg/ml de IP-10 (**tabla 2**). Gro-α e IP-10 son quimiocinas responsables del reclutamiento de linfocitos T a la zona donde se expresan. Por tanto, las células A431 y MDA-MB-468, como las células U87MGwtEGFR, secretan citocinas en el medio, después de exposición a poliIC/MPPE.

Tabla 2. Expresión de citocinas en el medio de células transfectadas con poliIC/MPPE

	A431		MDA-M	-468
poliIC/MPPE	-	+	-	+
IPN-β (pg/ ml)	0	5,1	0	4,1
Gro-α (pg/ ml)	14	148	0	121
IP-10 (pg/ ml)	23	188	20	138

Ejemplo 2. Activación *in vitro* de células inmunitarias humanas.

Dados los resultados anteriores, planteamos la hipótesis de que el medio enriquecido de citocinas de células A431 y MDA-MB-468 tratadas con poliIC/MPPE debe estimular el sistema inmunitario. Examinamos si esto era sí, ensayando el efecto del medio de células cancerosas transfectadas con poliIC sobre leucocitos mononucleares en la sangre periférica (PBMC) humanos sanos. Los PBMC consisten en varios tipos de células inmunitarias (NK, linfocitos T, linfocitos NK-T, macrófagos). Cuando se activan, estas células producen citocinas tóxicas, tales como IFN-γ y TNF-α, que se sabe que son eficaces contra diversas células cancerosas. Los PBMC también interactúan entre sí, dando lugar a un efecto sinérgico altamente antiproliferativo. Por ejemplo, los linfocitos T activados y los linfocitos NK producen IFN-γ, que activa los macrófagos y estimula la producción de TNF-α. La liberación de IL-2 en el medio se correlaciona directamente con la activación de PBMC y puede cuantificarse convenientemente por ELISA. Por tanto, los PBMC son un sistema conveniente para estudiar la reacción inmunitaria selectiva contra células tumorales transfectadas con poliIC.

Los PBMC se expusieron al medio de células cancerosas transfectadas con poliIC/MPPE. Para este fin, se sembraron 500 000 PBMC en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante una noche en 0,5 ml de medio como se describe en los procedimientos. Los PBMC entonces se expusieron a 0,5 ml de medio retirado de células A431, MDA-MB-468, U87MG o U138MG transfectadas con poliIC/PEI-PEG-EGF+PEI-Mel 48 h después de la transfección. El medio de PBMC se recogió 24 y 48 horas después de la exposición y se midió IFN-γ, IL-2 y TNF-α usando ensayos de ELISA. La figura **1A** muestra la inducción de expresión de IL-2 por PBMC, 24 y 48 h después de la exposición. El medio de células A431 y MDA-MB-468 transfectadas con poliIC/MPPE (0,1 µg/ml) dio lugar a que los PBMC produjeran hasta 165 pg/ml de IL-2. Por el contrario, el medio de células U87MG tratadas con poliIC/MPPE (con expresión ~12 veces menor de EGFR que células A431 y MDA-MB-468) o células U138MG (sin expresión de EGFR) no afectó a los PBMC. Se obtuvieron resultados similares cuando se examinaba la expresión de otras citocinas: tanto IFN-γ (figura **1B**) como TNF-α (figura **1C**) se inducían en PBMC expuestos al medio de células A431 y MDA-MB-468 transfectadas con poliIC/MPPE, pero no de células U87MG transfectadas con poliIC/MPPE y células U138MG transfectadas con 0,1 µg/ml de poliIC/MPPE.

Ejemplo 3. Activación de PBMC *in vivo*.

La expresión de estas citocinas selectivamente en tumores que sobreexpresan EGFR se confirmó también *in vivo* (**tabla 3**). A ratones SCID-NOD que albergan tumores subcutáneos que sobreexpresan EGFR en el flanco derecho y tumores U138MG en el flanco izquierdo se les trató por vía intravenosa con 4 inyecciones diarias consecutivas del poliIC/MPPE seguido de una sola inyección intraperitoneal de cuatro millones de PBMC. La expresión de y, a concentraciones mucho mayores, en los tumores que sobreexpresan EGFR (**tabla 3**). Se esperaba que estas citocinas atrajeran PBMC selectivamente a los tumores que sobreexpresan EGFR, donde los PBMC se activarían.

Tabla 3 Patrón de expresión de citocinas *in vivo*

poliIC/MPPE/PBMC	MDA-MB-468											
	IP10		Gro- α		IF		IL2		IFN γ		TNF α	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
MDA-MB-468	0	218	201	442	0	4	0	151	0	24	0	0,89
U138MG	0	46	322	360	0	0	0	33	0	0	0	0
Sangre	12	81	45	225	0	0	0	52	0	2	0	0
Sangre 3 días	11	89	52	203	0	0	-	-	-	-	-	-

poliIC/MPPE/PBMC	A431											
	IP10		Gro- α		IFN β		IL2		IFN γ		TNF α	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
A413	16	346	411	870	0	12	0	112	0	38	0	0,74
U138MG	0	66	240	410	0	0	0	18	0	0	0	0
Sangre	22	99	63	263	0	0	0	37	0	6	0	0,12
Sangre 3 días	34	70	44	294	0	3	-	-	-	-	-	-

Entonces nos preguntamos si la concentración de las citocinas en los tumores que sobreexpresan EGFR transfectados con vector es suficientemente alta para realmente atraer y activar células inmunitarias. En un experimento diferente, las células se inyectaron s.c. en el flanco derecho (A431 o MDA-MB-468) e izquierdo (U138MG) de ratones SCID-NOD. Cuando los tumores alcanzaron aprox. 100 mm³, se inició el tratamiento con 3 inyecciones I.V. consecutivas de poliIC/MPPE de 5 μ g/ratón/día. A las 24 h después de la última inyección de poliIC/MPPE, se inyectaron I.P. 3 millones de PBMC. A las 24 h después, los tumores se extrajeron, y se fijaron en formol al 4 %. Entonces se prepararon secciones de parafina, se tiñeron con H&E y se sometieron a análisis histopatológico. Las líneas discontinuas de la figura 2 muestran zonas de infiltración de células inmunitarias en que se detectó infiltración de los PBMC en los tumores que sobreexpresan EGFR de los animales tratados con poliIC/+PBMC. Se detectó infiltración de células inmunitarias en tumores U138MG, que no sobreexpresan EGFR. Se detectaron animales tratados con poliIC/+PBMC. No se detectó infiltración de células inmunitarias en tumores U138MG, que no sobreexpresan EGFR.

Ejemplo 4. Efecto de circunstante mediado por PBMC.

La expresión de IFN- γ y TNF- α , citocinas antitumorales potentes, mediante la destrucción por efecto de circunstante directo de células cancerosas no transfectadas. La cuestión es, entonces, si el nivel de estas citocinas es suficientemente alto, no solamente para atraer a las células inmunitarias, sino también para activarlas. Para examinar los efectos de circunstante mediados por PBMC, en primer lugar, se transfectaron células A431 o MDA-MB-468 con poliIC/MPPE y 48 h después se expusieron PBMC al medio de las células transfectadas (procedimientos). Después de otras 48 h, el medio de los PBMC expuestos se añadió a células no transfectadas recién sembradas (figura 3). El efecto de circunstante mediado por PBMC se examinó 24 y 48 h después de intercambio del medio y se comparó con el efecto de circunstante "directo", mediado por el medio de células A431 y MDA-MB-468 tratadas con poliIC/MPPE (figuras 3A y 3C). Los efectos de circunstante tanto directos como mediados por PBMC son muestran claramente en la figura 3. El efecto mediado por PBMC fue particularmente fuerte, destruyendo hasta una 90 % de las células no transfectadas. Las células U138MG, que no expresan EGFR en absoluto, también se inhibieron de forma eficaz por ambos tipos de medio (figuras 3B y 3D). No se observó ningún efecto cuando pIC se remplazaba por poli(ácido glutámico) (pGlu), que forma de forma similar partículas con MPPE, pero no induce una respuesta inmunitaria. Estos resultados sugirieron que la combinación de poliIC/MPPE y PBMC sinergizaría para destruir de forma eficaz las células cancerosas.

Ejemplo 5. Los PBMC potencian fuertemente la destrucción de células cancerosas por poliIC/MPPE *in vitro*.

Para examinar el efecto destructivo sinérgico del cáncer, las células tumorales (cultivadas como se describe en los procedimientos) se transfectaron con poliIC/MPPE a dosis baja (0,1 μ g/ml). A las 24 h después, se añadieron 500 000 PBMC/por pocillo a las células cancerosas y se coincubaron durante otras 24 h seguido de la adición de PBMC (figura 4). Para distinguir las células tumorales de los PBMC, las células tumorales se marcaron con anticuerpo contra EGFR conjugado con FITC (fluorescencia verde). Las células tumorales que experimentan apoptosis se detectaron con un kit de anexina-V-biotina, Biosource Inc. (fluorescencia roja). Las células tratadas con poliIC/MPPE en solitario o PBMC en solitario mostraron una señal apoptótica muy débil. Por el contrario, se obtuvo una señal apoptótica muy fuerte cuando las células que sobreexpresan EGFR se trataron tanto con poliIC/MPPE como con PBMC (figura 4A, B). Las células U138MG no experimentaron apoptosis detectable (figura 4C). Por tanto, la adición de PBMC a células tumorales tratadas con poliIC/MPPE potenció fuertemente la apoptosis de células tumorales.

Ejemplo 6. La aplicación sistémica de poliIC/MPPE combinado con PBMC cura a ratones con tumores diseminados.

En vista de nuestro hallazgo anterior de que el vector dirigido a EGFR cargado con poliIC no tenía efectos tóxicos

sobre células cerebrales normales en cultivo tisular o *in vivo* (Shir *et al.*, 2006), se examinó si poliIC/MPPE dirigido a EGFR podría aplicarse de forma sistémica, para el tratamiento de tumores que sobreexpresan EGFR diseminados *in vivo*. En ausencia de un modelo de ratón de tumores que sobreexpresan EGFR, se inyectaron i.v. 2 millones de células A431 o MDA-MB-468 humanas en ratones SCID-NOD como se describe en los procedimientos. Diez días después de la inyección de células, se inició el tratamiento, con dos ciclos de 3 días y un ciclo de 4 días de inyecciones diarias de 20 µg de poliIC/MPPE, con un intervalo de 24 horas entre cada ciclo (es decir, un total de 10 inyecciones, repartidas durante 12 días). Este procedimiento eliminó los efectos tóxicos del tratamiento como pérdida de peso (datos no mostrados). Los ratones que albergaban tumores A431 que recibieron poliIC/MPPE sobrevivieron al menos 3 veces más tiempo que los ratones no tratados, y tres ratones se curaron completamente (figura 5D). Los ratones que albergaban tumores MDA-MB-468 tratados con poliIC/MPPE sobrevivieron hasta dos veces el tiempo de los ratones no tratados (figura 5E).

Estos resultados, combinados con el hallazgo de que los PBMC potencian fuertemente el efecto de poliIC/MPPE *in vitro*, nos alentó a ensayar si los PBMC potenciarían de forma similar el efecto de poliIC/MPPE *in vivo*. Para estos experimentos, esperamos 15 días después de la inyección de células A431 o MDA-MB-468 en ratones SCID-NOD, punto en que podía detectarse tumores grandes de hasta 500 µm en los pulmones (figura 5). Los ratones entonces se trataron con 4 inyecciones intravenosas diarias consecutivas de 20 µg de poliIC/MPPE. Los grupos de control incluían ratones tratados con pGlu/MPPE (poli(ácido glutámico)/MPPE) para determinar el efecto del conjugado sin poliIC. A las 24 h después de la inyección final de poliIC, a los ratones se les inyectó una vez cuatro millones de PBMC humanos. La "reconstitución" del sistema inmunitario del ratón SCID-NOD usando PBMC humanos es una práctica común. Como en el experimento anterior, los ratones tratados con poliIC-MPPE que albergaban tumores A431 sobrevivieron más tiempo que los ratones no tratados. Los ratones que se trataron tanto con poliIC-MPPE como con PBMC humanos sobrevivieron durante más de un año, y no mostraron ningún signo de tumores (figura 5B). Asimismo, los ratones que albergaban tumores MDA-MB-468 tratados con poliIC/MPPE en solitario sobrevivieron hasta dos veces el tiempo de los ratones no tratados, mientras que los ratones tratados tanto con poliIC/MPPE como con PBMC sobrevivieron más de un año y no mostraron ningún síntoma de tumores (figura 5C). No se observó toxicidad significativa, reducción en el peso o comportamiento anómalo durante el tratamiento o después de ello. Por tanto, introduciendo PBMC humanos, pudimos reducir significativamente la dosificación de poliIC/MPPE y eliminar tumores diseminados establecidos. Por tanto, los PBMC desempeñan una función crucial en la erradicación de los tumores.

Ejemplo 7. Comparación de los vectores de segunda generación con los vectores de la primera generación

Los vectores de segunda generación avanzados proporcionados por la presente invención, denominados en este documento pIC/P₂₂₁PE y pIC/P₂₂₁GE11, están compuesto de poliIC en complejo con los conjugados P₂₂₁PE y P₂₂₁PGE11, respectivamente. Estos conjugados comprenden polietilénimina lineal, PEG y EGF o el péptido GE11, en lugar de la polietilénimina ramificada del conjugado MPPE de los vectores de primera generación, y son significativamente más simples de producir, pueden prepararse en lotes más grandes y más uniformes, y los vectores resultantes muestran actividad de destrucción de células cancerosas mejorada respecto a los vectores de primera generación.

7.1 Preparación de los nuevos conjugados P₂₂₁PE y P₂₂₁PGE11

Para la síntesis de los conjugados novedosos, se usó PEG bifuncional (NHS-PEG2k-OPSS, de Nektar Therapeutics, EE. UU.); PEGila PEI lineal en un extremo y se acopla con HS-mEGF o HS-GE11 en el extremo distal mediante el resto de OPSS (disulfuro de ortopiridilo) mediante un puente disulfuro. Este procedimiento de dos etapas simple evita el régimen de purificación tedioso aplicado para la síntesis de MPPE (véanse los procedimientos, punto (ii), anteriormente en este documento), que produce un rendimiento global mucho mayor.

El péptido GE11 puede sintetizarse por procedimientos recombinantes bien conocidos en la técnica o puede sintetizarse usando técnicas bien conocidas de síntesis química, por ejemplo, usando un sintetizador automatizado (disponible en, por ejemplo, Applied Biosystems, Alemania), por ejemplo, usando los protocolos de la empresa para la técnica con t-butiloxicarbonilo (t-Boc). La purificación puede hacerse por HPLC en fase inversa.

Los vectores pIC/P₂₂₁PE (pIC/PPE) y pIC/P₂₂₁PGE11 (pIC.PPGE) se obtienen mezclando poliIC con el conjugado PPE o PPGE11.

7.2 Comparación de vectores de primera y segunda generación *in vitro*.

Como la sensibilidad de las células a los vectores de la invención es una función de su nivel de expresión de EGFR, fue interesante evaluar la capacidad de los diferentes vectores de destruir células que tienen diversos niveles de expresión de EGFR. Para este fin, se sembraron 3000 células U138MG y 4000 células de cada una de las otras líneas celulares mostradas en la tabla 4, en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante una noche. Las células entonces se transfectoraron con pIC formulado con el conjugado indicado. La supervivencia de las células se analizó mediante ensayo de azul de metileno 48 h después de la transfección. La tabla 4 muestra las células usadas y el nivel de expresión de EGFR:

Tabla 4. Líneas celulares usadas y su nivel de expresión de EGFR

Línea celular	Moléculas de receptor de EGF /célula
U138MG	-
MCF7	0,8-5 x 10 ³
U87MG	1 x 10 ⁵
MDA-MB-231 (MDA231)	3-7 x 10 ⁵
U87MGwtEGFR	1 x 10 ⁶
MDA-MB-468 (MDA468)	2 x 10 ⁶

Como puede verse en la figura 6, el vector de segunda generación novedoso pIC/P₂₂₁PE tiene efecto algo más fuerte sobre células con alta expresión de EGFR (MDA-MB-468) y efecto significativamente más fuerte sobre células con menor expresión de EGFR (U87MG) que el vector de primera generación pIC/MPPE. Por tanto, pIC/P₂₂₁PE debe ser significativamente más beneficioso sobre tumores con expresión relativamente menor de EGFR.

7.3 Comparación de PPE con PPGE11 *in vitro*.

La capacidad de destrucción celular del vector pIC/P₂₂₁PGE11, que tiene un péptido de unión a EGFR en lugar de EGF como resto de dirección, se comparó con la de pIC/P₂₂₁PE. Como se ve en la figura 7, P₂₂₁PE fue muy eficaz, destruyendo hasta un 90 % de las células MDA-MB-468 a solamente 0,01 µg/ml de pIC. No se observó ningún efecto sobre células con expresión baja o nula de EGFR a esta concentración de pIC. El pIC/P₂₂₁PGE11 fue algo menos eficaz. Además, hasta un 80 % de las células MDA-MB468 pudieron destruirse mediante pIC/PPGE11 a 0,1 µg/ml con efecto mínimo sobre las células de control.

7.4 Eficacia de vectores de primera y segunda generación *in vivo*.

La eficacia de pIC/P₂₂₁PE y pIC/MPPE se comparó adicionalmente *in vivo*. A ratones hembra se les inyectó s.c. 2 millones de células A431 disueltas en PBS. Cuando los tumores alcanzaron el tamaño de aproximadamente 75-80 mm³, los ratones se dividieron en 5 grupos. El pIC formulado con el conjugado indicado se inyectó IV cada 48 h. El pIC/PPE mostró eficacia incluso más fuerte que pIC/MPPE en la inhibición del crecimiento del tumor A431 (figura 8A), y el pIC/PPE conservó su selectividad como puede verse por la ausencia de influencia sobre el crecimiento de tumores U138MG (que no expresan EGFR) incluso a dosis altas (figura 8B).

Referencias

- Butowski N, *et al.* (2009) A phase II clinical trial of poly-ICLC with radiation for adult patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma: a North American Brain Tumor Consortium (NABTC01-05). *J Neurooncol* 91:175-82.
- Ciceri F, *et al.* (2007) Antitumor effects of HSV-TK-engineered donor lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation. *Blood* 109:4698-707.
- Fujimura T, Nakagawa S, Ohtani T, Ito Y, Aiba S (2006) Inhibitory effect of the polyinosinic-polycytidylic acid/cationic liposome on the progression of murine B16F10 melanoma. *Eur J Immunol* 36:3371-80.
- Hynes NE, MacDonald G (2009) ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol* 21:177-84.
- Li, Z. *et al.* (2005) Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics, *FASEB J.* 19:1978-85.
- Rosenberg SA (2008) Overcoming obstacles to the effective immunotherapy of human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:12643-4.
- Salazar AM, *et al.* (1996) Long-term treatment of malignant gliomas with intramuscularly administered polyinosinic-polycytidylic acid stabilized with polylysine and carboxymethylcellulose: an open pilot study. *Neurosurgery* 38:1096-103; discusión 1103-4.
- Shir A, Ogris M, Wagner E, Levitzki A (2006) EGF receptor-targeted synthetic double-stranded RNA eliminates glioblastoma, breast cancer, and adenocarcinoma tumors in mice. *PLoS Med* 3:e6.
- Song, S. *et al.* (2008) Peptide ligand-mediated liposome distribution and targeting to EGFR expressing tumors in vivo, *Int J Pharmaceuticals* 363: 155-161.

Listado de secuencias

- <110> LEVITZKI, Alexander
- <120> Vector de ARN bicatenario dirigido a EGFR para tratamiento sistémico del cáncer
- <130> T2348 EP/1 S3
- <150> US61/139698
- <151> 22/12/2008
- <160> 1

ES 2 764 396 T3

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido sintético

<400> 1

Tyr His Trp Tyr Gly Tyr Thr Pro Gln Asn Val Ile
1 5 10

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para administración sistémica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un vector dirigido a EGFR que comprende una molécula de ARN(bc) bicatenaria, un vehículo de ARNbc y un péptido o polipéptido de unión a EGFR, en la que dicho vehículo de ARNbc es polietilenimina lineal unida covalentemente a polietilenglicol (PEG), y en la que dicha molécula de ARNbc está fijada no covalentemente a dicho vehículo de ARNbc.
- 10 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la molécula de ARNbc está compuesta de una hebra de poli(ácido inosínico) y una hebra de poli(ácido citidílico) (poliIC) que tiene al menos 22 ribonucleótidos en cada hebra.
- 15 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en la que el poliIC tiene 85-300 ribonucleótidos en cada hebra.
4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho polipéptido de unión a EGFR es EGF.
- 20 5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho péptido de unión a EGFR es el péptido GE11 de la secuencia YHWYGYTPQNVV.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 o 5, en la que dicho vector es poliIC/polietilenimina lineal-polietilenglicol-mEGF (pIC/PPE) o poliIC/polietilenimina lineal-polietilenglicol-péptido GE11 (pIC/PPGE11).
- 25 7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento del cáncer seleccionado de carcinoma broncopulmonar no microcítico, cáncer de mama, glioblastoma, carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, adenocarcinoma, cáncer de ovario, cáncer de vejiga o cáncer de próstata, y metástasis de los mismos.

Fig. 1A

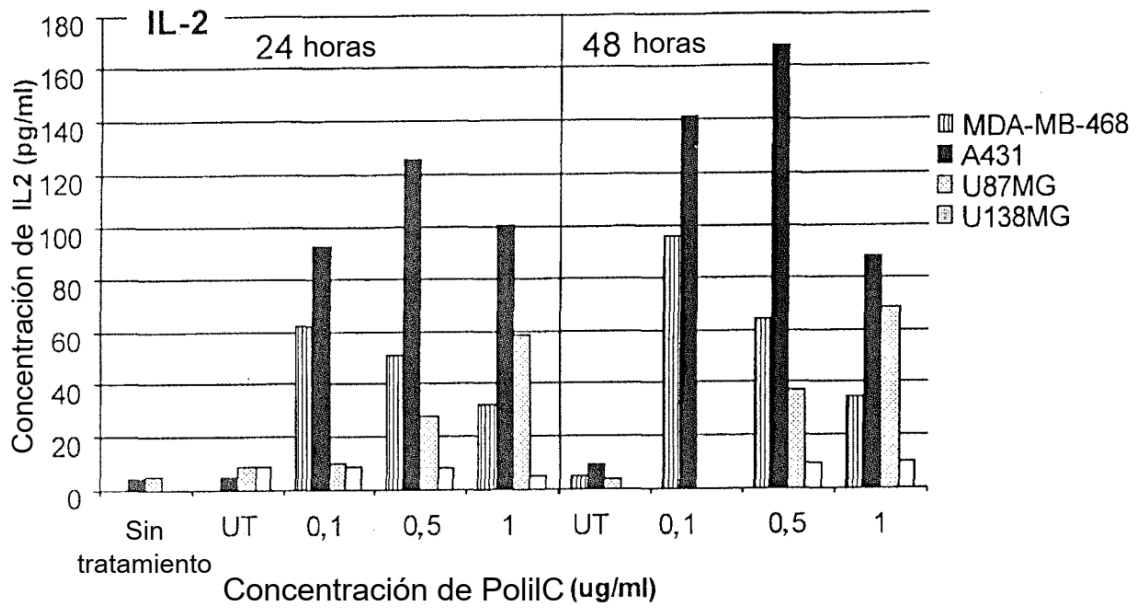


Fig. 1B

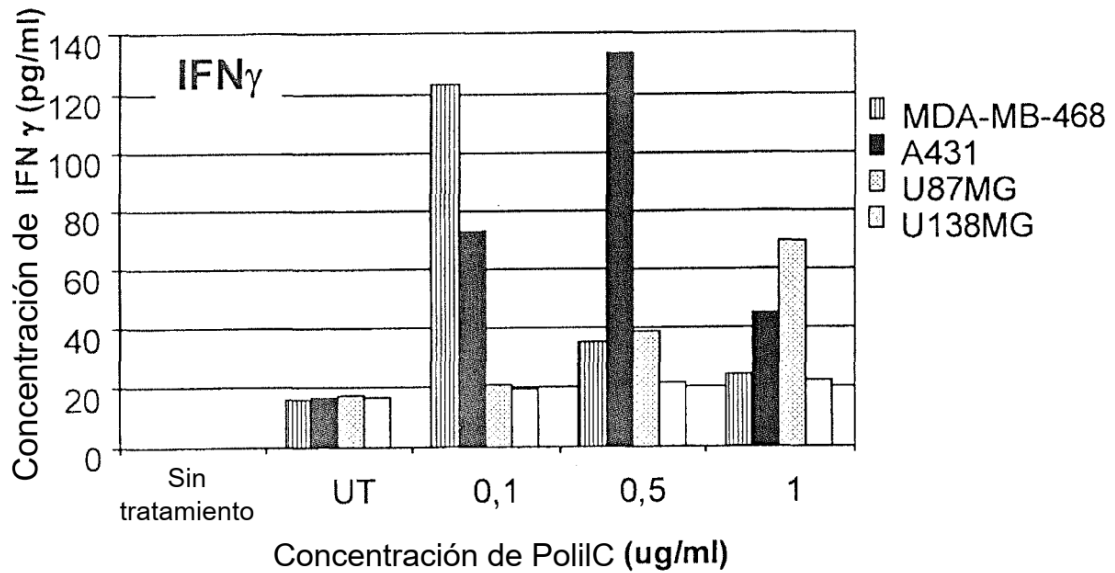


Fig. 1C

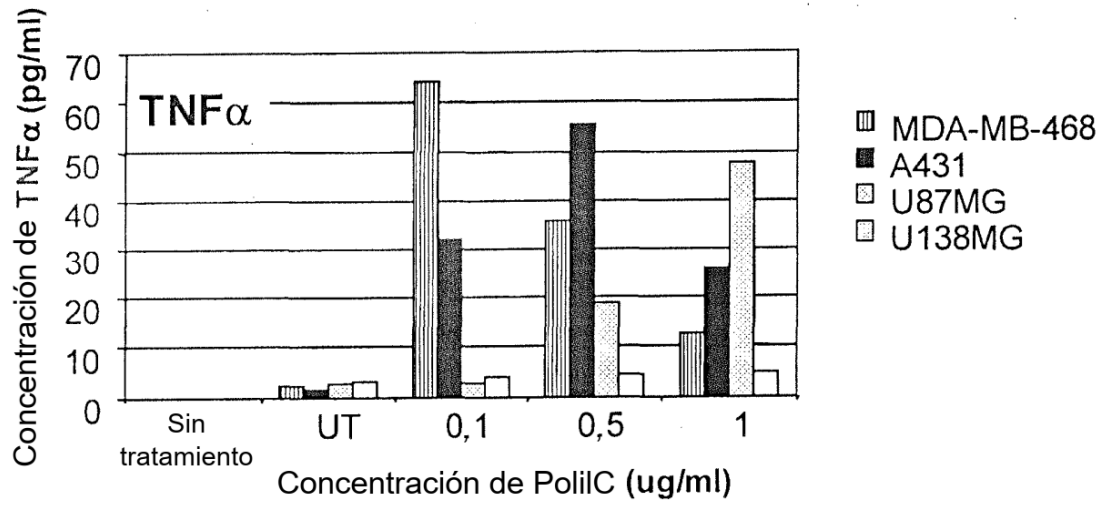


Fig. 2A

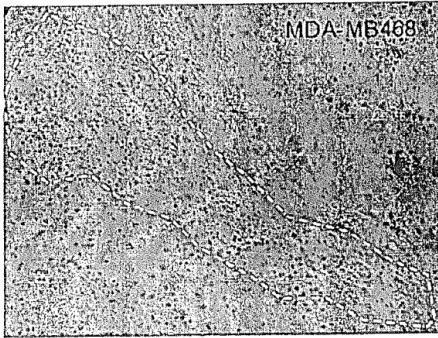


Fig. 2B

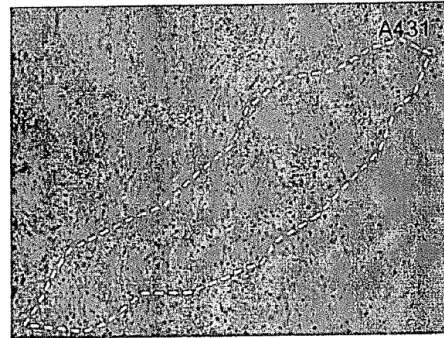


Fig. 2C

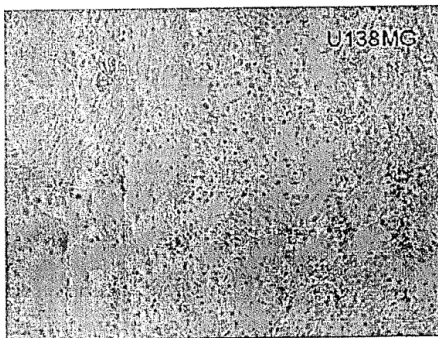


Fig. 2D

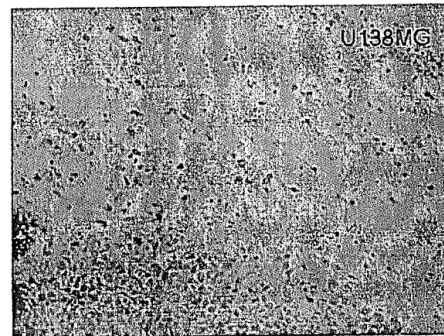


Fig. 3A

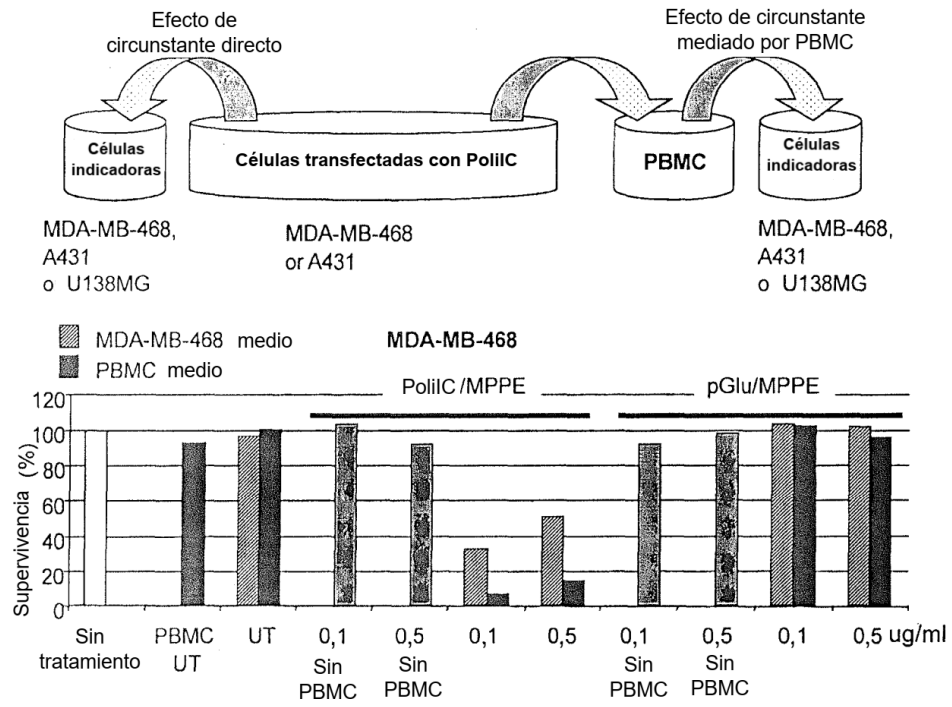


Fig. 3B

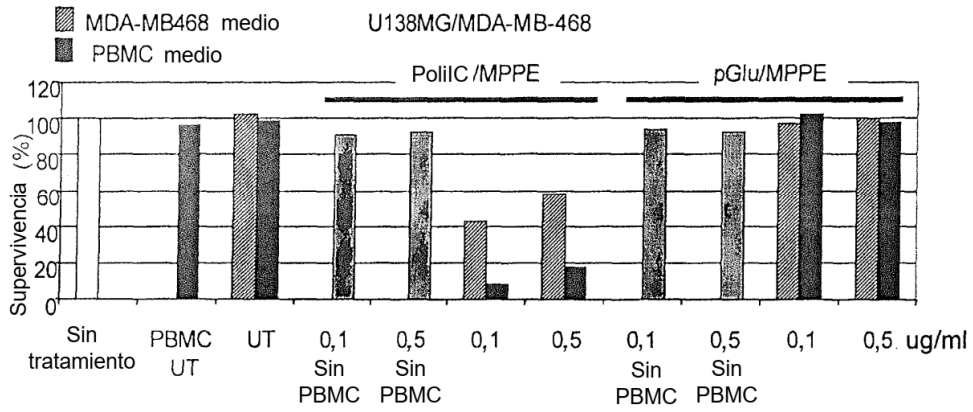


Fig. 3C

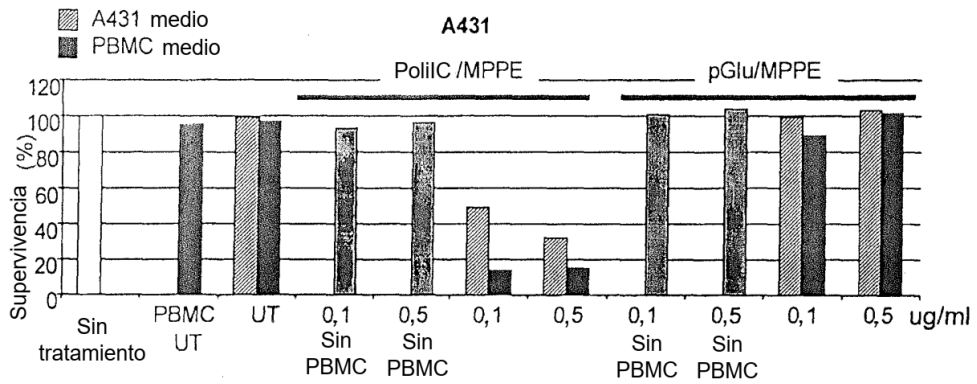


Fig. 3D

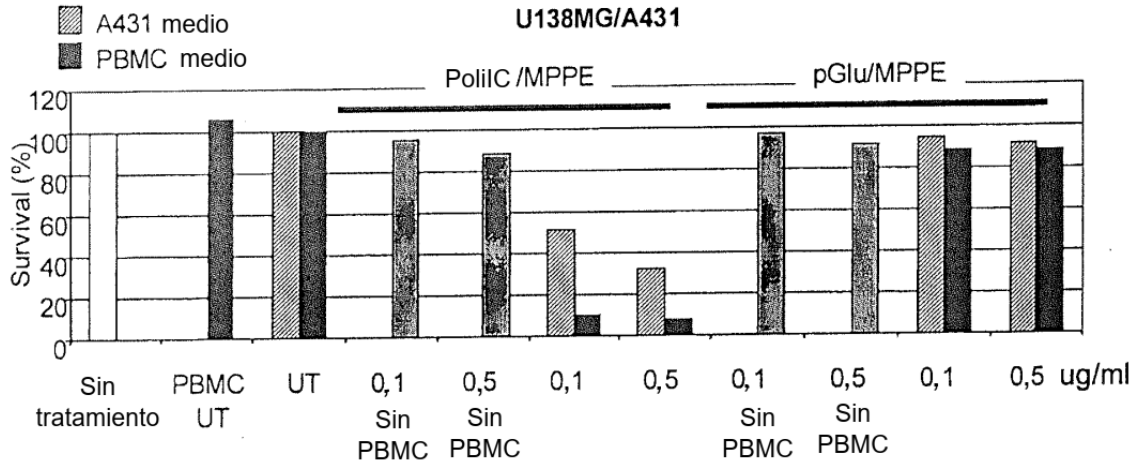


Fig. 4A

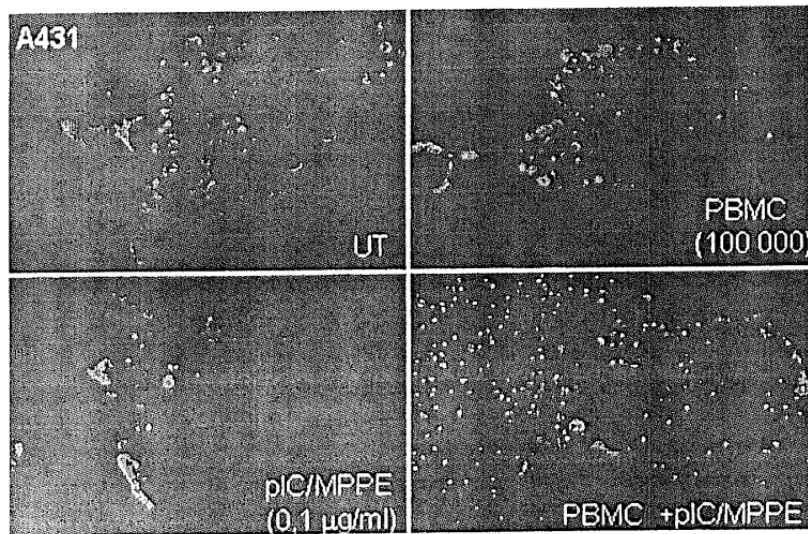


Fig. 4B

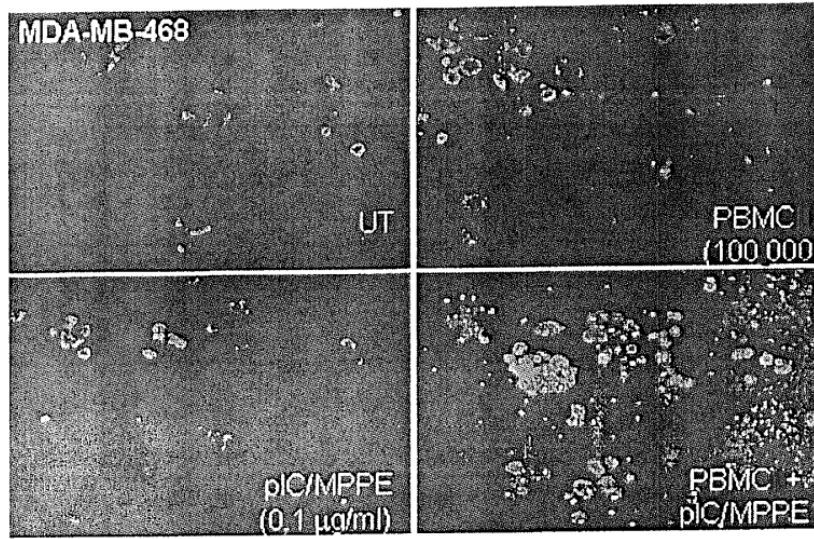


Fig. 4C

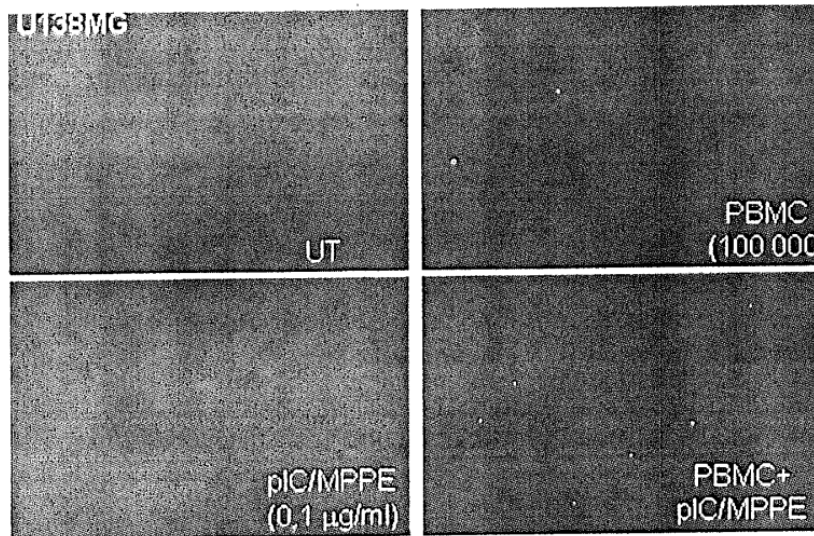


Fig. 5A

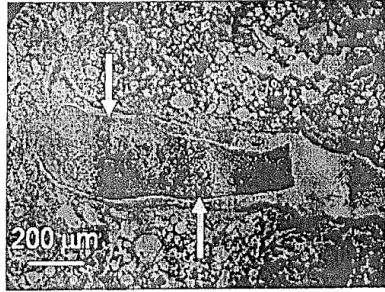


Fig. 5B

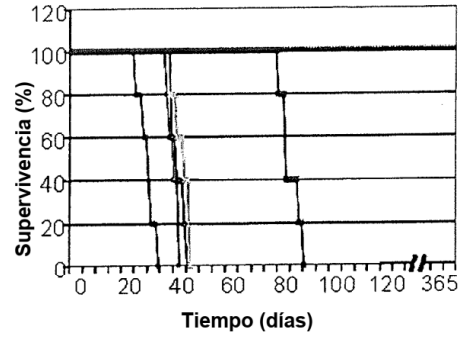


Fig. 5C

- ◆ UT
- pGlu/MPPE+PBMC
- PBMC
- PolilC/MPPE
- pGlu/MPPE
- ◆ PolilC/MPPE+PBMC

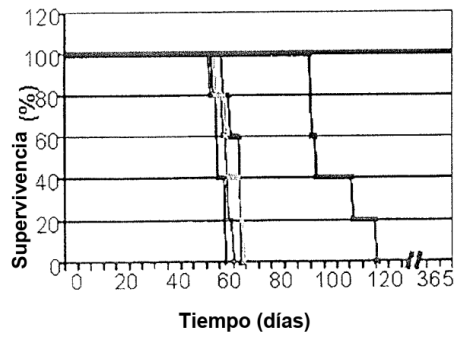


Fig. 5D

- ◆ UT
- HBG
- ▲ PolilC/MPPE

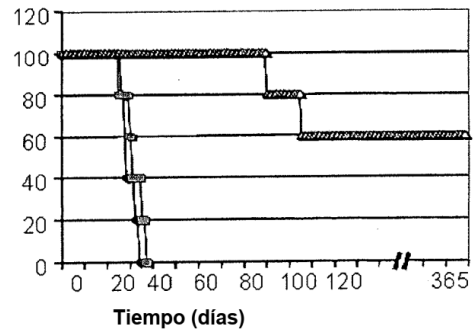


Fig. 5E

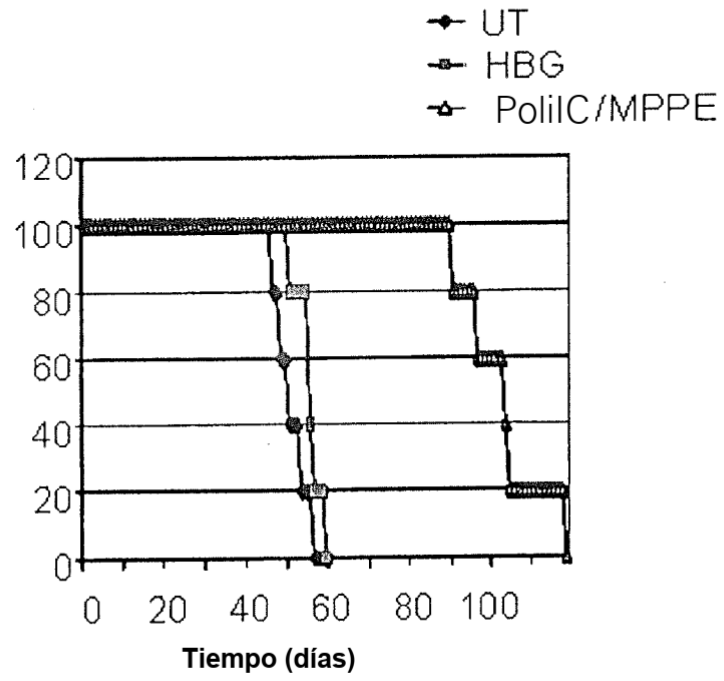


Fig. 6

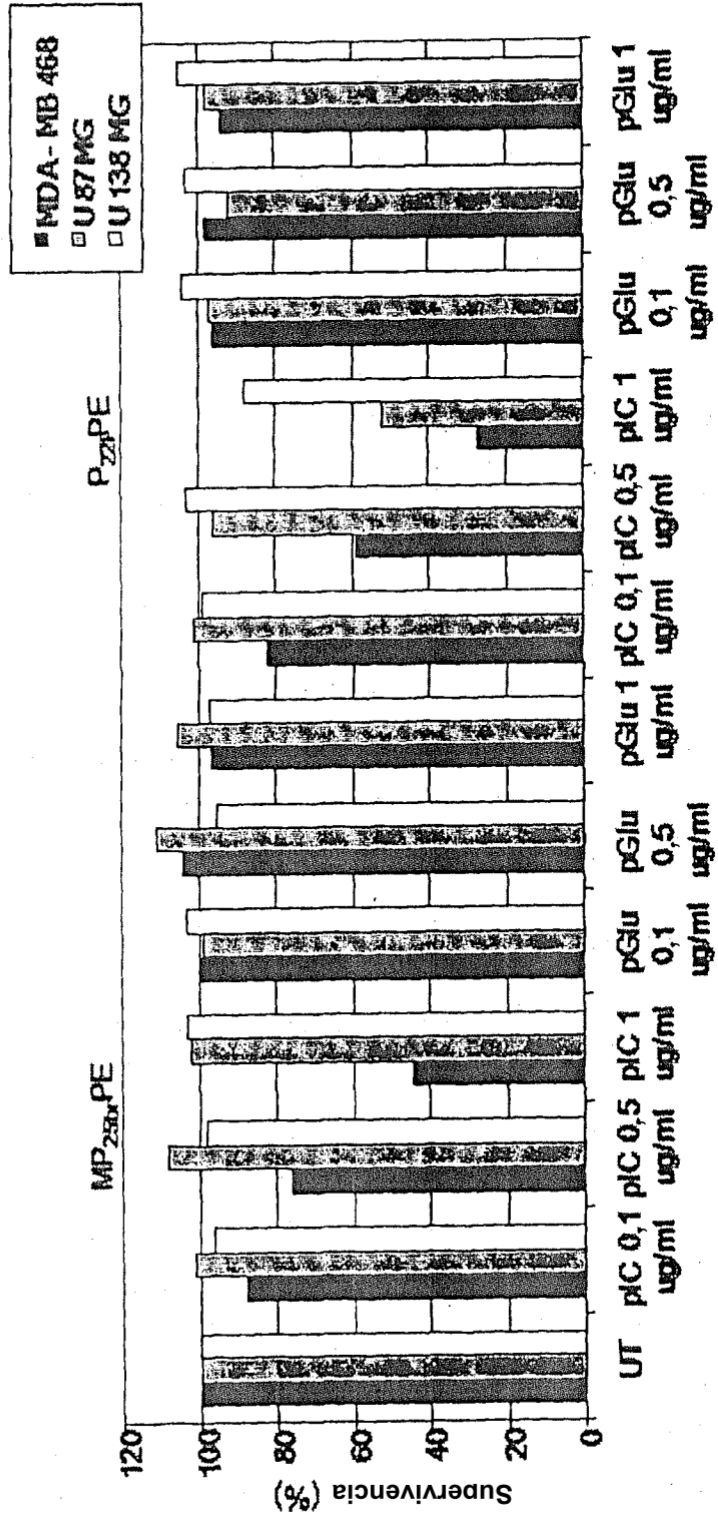


Fig. 7

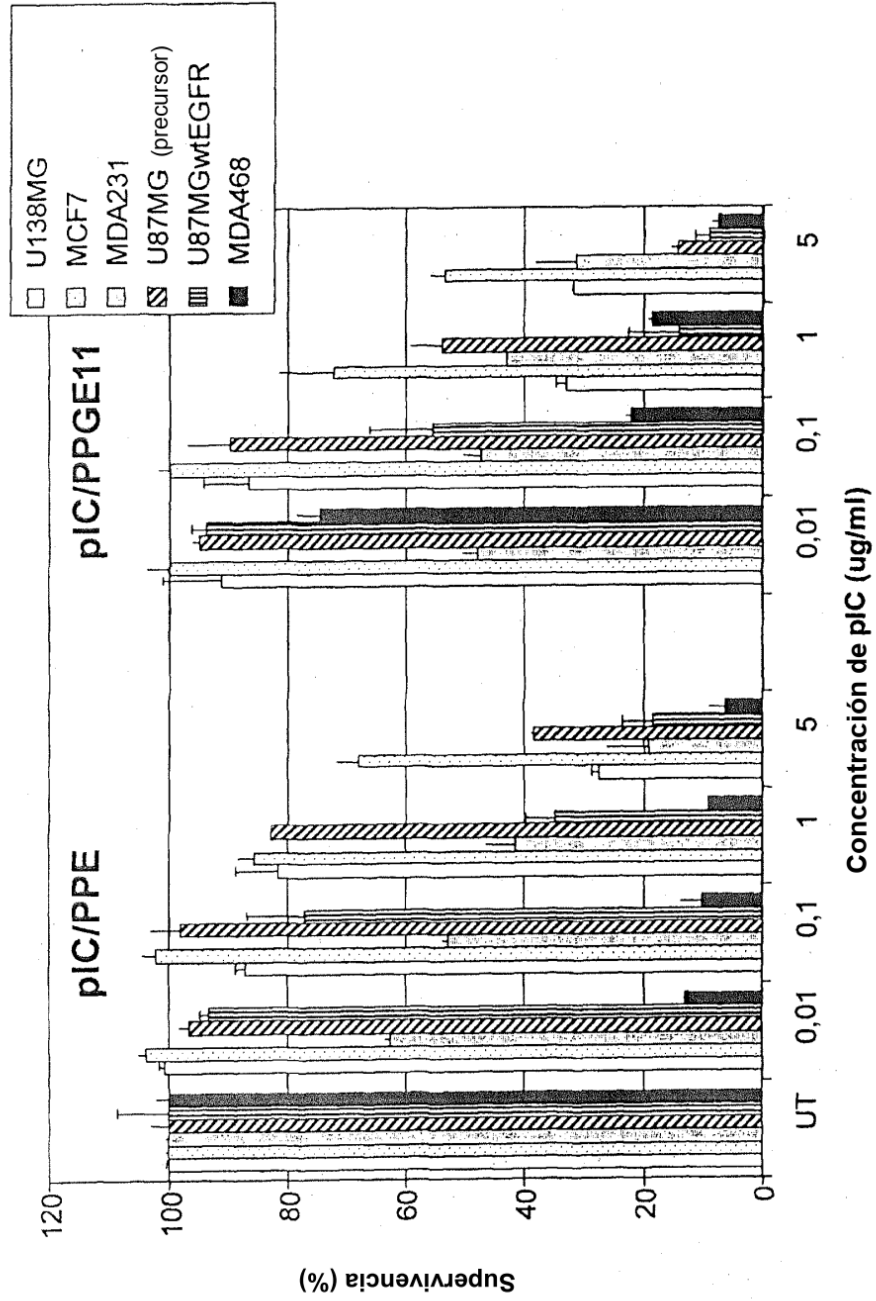


Fig. 8A

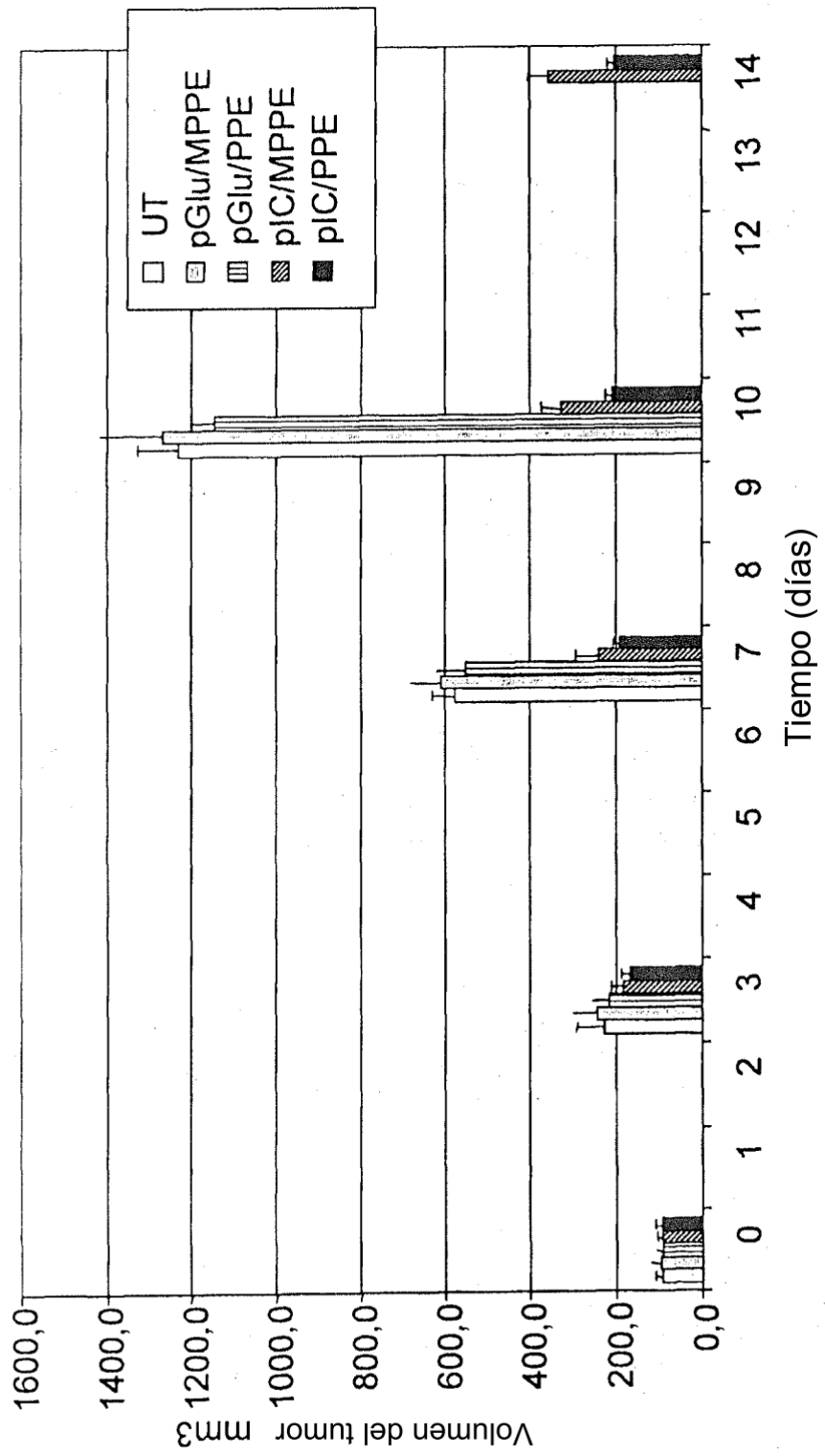


Fig. 8B

