



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 297 853**

51 Int. Cl.:
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97912262 .9**
86 Fecha de presentación : **27.10.1997**
87 Número de publicación de la solicitud: **0941252**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.1999**

54 Título: **Fragments de anticuerpos de cadena única anti-p53 y utilizaciones.**

30 Prioridad: **29.10.1996 FR 96 13176**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

73 Titular/es: **Aventis Pharma S.A.**
20, avenue Raymond Aron
92160 Antony, FR

72 Inventor/es: **Bracco, Laurent y**
Debussche, Laurent

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 297 853 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).

ES 2 297 853 T3

DESCRIPCIÓN

Fragmentos de anticuerpos de cadena única anti-p53 y utilizaciones.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para restaurar en células que presentan una proteína p53 mutada, desprovista o disminuida de su función de factor de transcripción, una actividad de transactivación dependiente de p53. Más particularmente, el procedimiento de la invención se basa en la utilización de anticuerpos de cadena simple capaces de unirse específicamente a la proteína p53 mutada. Se refiere igualmente a nuevas moléculas capaces de unirse específicamente y eficazmente a las proteínas p53, y que permiten además restaurar una actividad de p53
10 en células tumorales, así como los ácidos nucleicos que codifican estas moléculas y los vectores que las contienen. Este procedimiento y las moléculas de la invención son utilizables *in vitro* o *ex vivo* para estudiar el mecanismo de acción de p53 y de sus formas mutadas o para purificar las proteínas p53. Presentan igualmente utilizaciones *in vivo*, principalmente en aproximaciones terapéuticas de restauración de la actividad de p53 en contextos patológicos tales como principalmente los cánceres.

15 La proteína p53 natural interviene en la regulación del ciclo celular y en el mantenimiento de la integridad del genoma de la célula. Esta proteína, cuya función principal es la de ser un activador de la transcripción de determinados genes, es susceptible, por un proceso todavía no bien definido, de bloquear la célula en fase G1 del ciclo celular en el momento de la aparición de mutaciones en el transcurso de la replicación del genoma, y de desencadenar un determinado número de procesos de reparación del ADN. Además, en caso de mal funcionamiento de estos procesos de reparación o en caso de aparición de casos mutacionales demasiado numerosos para ser corregidos, esta proteína es capaz de inducir el fenómeno de muerte celular programada, denominado apoptosis. De esta manera, la proteína p53 actúa como un supresor del tumor, al eliminar las células diferenciadas de modo anormal o cuyo genoma ha sido
20 dañado.

25 Esta función principal de la p53 depende de su función de factor de transcripción, es decir en otras palabras de su doble capacidad para reconocer secuencias específicas a nivel del ADN genómico y para incorporar la maquinaria general de la transcripción.

30 La proteína p53 comprende 393 aminoácidos, que definen 5 dominios funcionales:

- 35 - el dominio activador de la transcripción, constituido por los aminoácidos 1 a 73, capaces de unirse a determinados factores de la maquinaria general de la transcripción como la proteína TBP. Este dominio también es el sitio de un determinado número de modificaciones tras la traducción. Es igualmente el sitio de numerosas interacciones de la proteína p53 con numerosas otras proteínas y principalmente con la proteína celular mdm2 o la proteína EBNA5 del virus de Epstein-Barr (EBV), capaces de bloquear la función de la proteína natural. Además, este dominio posee secuencias de aminoácidos denominadas PEST de susceptibilidad a la degradación proteolítica.
- 40 - el dominio de enlace al ADN, localizado entre los aminoácidos 73 y 315. La conformación de este dominio central de p53 regula el reconocimiento de las secuencias de ADN específicas de la proteína p53. Este dominio es el sitio de dos tipos de alteraciones que afectan la función de la proteína natural:
 - 45 (i) la interacción con las proteínas que bloquean la función de la p53 como el antígeno "gran T" del virus SV40 o las proteínas víricas E6 de los virus HPV16 y HPV18 capaces de provocar su degradación por el sistema de la ubiquitina. Esta última interacción no puede hacerse más que en presencia de la proteína celular E6ap (enzima E3 de la cascada de ubiquitinilación).
 - 50 (ii) las mutaciones puntuales que afectan la función de la p53 y cuya casi totalidad están localizados en esta región.
- 55 - la señal de localización nuclear, constituida por los aminoácidos 315 a 325, indispensable para el buen direccionamiento de la proteína en el compartimento donde va a ejercer su función principal.
- 60 - el dominio de oligomerización, constituido por los aminoácidos 325 a 355. Esta región 325 a 355 forma una estructura de tipo; hoja β (326-334)-codo (335-336)-hélice α (337-355). Las alteraciones de funciones localizadas en esta región son esencialmente debidas a la interacción de la proteína natural con las diferentes formas mutantes que pueden conducir a efectos variables sobre la función de la proteína natural.
- 65 - el dominio de regulación, constituido por los aminoácidos 365 a 393, que es el sitio de un determinado número de modificaciones tras la traducción (glucosilaciones, fosforilaciones, fijación de ARN,...) que modulan la función de la proteína p53 de manera positiva o negativa. Este dominio desempeña una función sumamente importante en la modulación de la actividad de la proteína natural.

65 El funcionamiento de la proteína p53 puede perturbarse de diferentes maneras.

- bloqueo de su función por un determinado número de factores como por ejemplo el antígeno "gran T" del virus SV40, la proteína EBNA5 del virus de Epstein-Barr o la proteína celular mdm2.

ES 2 297 853 T3

- desestabilización de la proteína por aumento de su susceptibilidad a la proteólisis, principalmente por interacción con la proteína E6 de los virus del papiloma humano HPV16 y HPV18, que favorece la entrada de la p53 en el ciclo de ubiquitinilación. En este caso la interacción entre estas dos proteínas no puede hacerse más que por la fijación anterior de una proteína celular, la proteína E6ap cuyo sitio de fijación es mal conocido.
- mutaciones puntuales a nivel del gen de la p53.
- supresión de uno o de los dos alelos de la p53.

Los dos últimos tipos de modificaciones se encuentran en aproximadamente el 50% de los diferentes tipos de cáncer. A este respecto, las mutaciones del gen de la p53 registradas en las células cancerosas alcanzan una parte muy grande del gen que codifica esta proteína, y dan como resultado modificaciones variables del funcionamiento de esta proteína. Puede sin embargo observarse que estas mutaciones están en su gran mayoría localizadas en la parte central de la proteína p53 de la que se sabe que es la región de contacto con las secuencias genómicas específicas de la proteína p53. Esto explica porqué la mayor parte de los mutantes de la proteína p53 presentan como característica principal no poder ya fijarse a las secuencias de ADN que reconoce la proteína natural y así de no poder ejercer más su función de factor de transcripción. Además, determinados mutantes parecen haber adquirido nuevas funciones tales como la activación de determinados genes a nivel de la transcripción.

Se reagrupa actualmente el conjunto de estas modificaciones en tres categorías:

- los mutantes denominados débiles, cuyo producto es una proteína no operativa, que, en el caso de mutación en uno solo de los dos alelos, no afecta el funcionamiento de la proteína natural codificada por el otro alelo. Los principales representantes de esta categoría son los mutantes H273 y W248, siendo esta última específica del síndrome familiar de Li-Fraumeni de hipersensibilidad a las afecciones cancerosas.
- los mutantes dominante-negativos, cuyo producto es una proteína no operativa, que, en el caso de mutación en uno solo de los dos alelos y por interacción con la proteína natural, es capaz de bloquear el funcionamiento de ésta por formación de oligómeros mixtos no-activos que no pueden ya fijarse a las secuencias de ADN específicas de la proteína natural. El principal representante de esta categoría es el mutante G281.
- los mutantes dominante-oncogénicos, cuyo producto es una proteína que es capaz por una parte de bloquear la función de la proteína natural como los mutantes de la categoría anterior, y por otra parte, de favorecer por mecanismos mal conocidos el desarrollo tumoral, que presentan así una ganancia de función. El principal representante de esta categoría es el mutante H175.

Teniendo en cuenta sus propiedades antitumorales y apoptóticas y de su implicación en numerosas patologías de tipo hiperproliferante, el gen p53 natural se ha utilizado en métodos de terapia génica y celular. En particular se ha propuesto tratar determinadas patologías hiperproliferantes, y principalmente cánceres, mediante la administración *in vivo* del gen p53 natural, por restauración de las funciones de p53. La administración puede realizarse preferentemente por vectores víricos y principalmente adenovíricos (documento de patente WO 94/24297) o retrovíricos (documento de patente WO 94/06910). Se ha mostrado así que la introducción de un ácido nucleico que codifica la proteína p53 natural permitía restaurar parcialmente una regulación normal del crecimiento celular (Roth *et al.*, Nature Medicine 2 (1996) 985). Se han desarrollado igualmente estrategias alternativas basadas en el empleo de moléculas quimeras que tienen propiedades del tipo p53 (documento PCT/FR96/01111).

Otra aproximación para restaurar las funciones de la proteína p53 natural está basada en la reversión de las proteínas mutadas endógenas hacia un fenotipo natural, es decir que presenta las propiedades supresora de tumor y apoptóticas de la p53 natural. Esta aproximación deriva de la puesta en evidencia de que las pérdidas de función de los mutantes de p53 se deben a un intercambio conformacional de la proteína inducido por la/las mutaciones. A este respecto, la solicitud de patente WO94/12202 muestra que un anticuerpo monoclonal particular, designado pAb421, dirigido contra la proteína p53, es capaz de restaurar a una cierta clase de mutantes frecuentemente representados en los cánceres humanos la función de unión ADN *in vitro*. La utilización de este tipo de compuestos presenta sin embargo inconvenientes importantes, unidos principalmente a la cantidad elevada de anticuerpos necesaria (y por lo tanto a los problemas de producción/purificación asociados) y a su débil penetración celular.

La presente solicitud de patente describe una aproximación más competente para restaurar las propiedades naturales de un mutante de la proteína p53. La presente solicitud de patente describe en particular la construcción de ligandos particularmente específicos de la proteína p53, que tiene propiedades ventajosas de restauración de las funciones p53 natural. Más particularmente, la presente solicitud de patente describe la construcción de anticuerpos de cadena simple (ScFv) específicos de la proteína p53, y principalmente de la molécula 11D3. La presente solicitud de patente muestra además que los ScFv son capaces de reconocer p53, de ser expresados eficazmente en el seno de una célula tumoral y de reactivar una parte de la función de transactivación de una cierta clase de mutantes de p53.

Con respecto a los métodos de la técnica anterior, esta molécula presenta ventajas importantes y principalmente la posibilidad de ser expresada *in situ* en una célula tumoral, en cantidades importantes: Los resultados presentados a continuación son aún más inesperados que las pérdidas de afinidad que se habían a menudo observado entre un

ES 2 297 853 T3

anticuerpo clásico y un ScFv. Además, el solicitante ha demostrado que es posible expresar los ScFv en los compartimentos celulares apropiados, que permiten obtener una actividad biológica óptima.

El documento WO96/30512 se refiere a un sistema de expresión condicional que se refiere a moléculas quimeras biespecíficas que comprenden (A) un primer dominio capaz de unir selectivamente una secuencia definida de ADN y (B) un segundo dominio detector capaz de unir específicamente un transactivador o un complejo transactivador, pudiendo ser este segundo dominio un ScFv dirigido contra p53. La restauración de las funciones transactivadoras de la proteína p53 con una construcción que comprende solamente un scFv o una secuencia que codifica un scFv y desprovista de elemento A, no se describe en este documento.

El documento *Cancer Research, Vol 55, Aug 15, 1995, pp 3490 - 3494*, muestra que el anticuerpo monoclonal mAb PA421 es capaz de restaurar la función de activación de la transcripción de ciertas formas mutadas de p53, sin embargo este documento no proporciona ninguna información sobre las propiedades de eventuales ScFv derivados de este anticuerpo monoclonal.

Un primer objetivo de la invención reside por lo tanto en un procedimiento para restaurar en células que presentan una proteína p53 mutada una actividad de transactivación dependiente de p53 que comprende la introducción en dicha célula de un anticuerpo de cadena simple capaz de unir específicamente la proteína p53 mutada. Ventajosamente, el procedimiento de la invención comprende la introducción en la célula de un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para dicho anticuerpo de cadena simple bajo el control de un promotor funcional en la célula. Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de un anticuerpo de cadena simple capaz de unir específicamente una proteína p53 mutada para modificar la conformación de dicha proteína. La invención se refiere igualmente a la utilización de un anticuerpo de cadena simple capaz de unirse específicamente a una proteína p53 mutada para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de desórdenes hiperproliferantes en los que está implicada una proteína p53 mutada, así como la utilización de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cadena simple capaz de unirse específicamente a una proteína p53 mutada para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de desórdenes hiperproliferantes en los que está implicada una proteína mutada p53.

El procedimiento de la invención se basa por lo tanto en parte en la construcción, la vectorización y la introducción en las células de anticuerpo de cadena simple capaces de unirse específicamente a una proteína p53 mutada. Los anticuerpos de cadena simple (ScFv) están constituidos esencialmente por una región VH unida a una región VL por un brazo. Se ha descrito la construcción de ScFv y de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos modificados por ejemplo en la patente US4 946 778 o en las solicitudes de patente WO94/02610, WO94/29446.

La presente solicitud de patente describe más particularmente la creación de un banco de hibridomas que producen anticuerpos dirigidos contra p53, y la construcción, a partir de este banco, de ScFv correspondientes. Describe igualmente el clonaje de ácidos nucleicos correspondientes en vectores de expresión y su transferencia en células. Muestra igualmente que esta transferencia permite, *in vivo*, restaurar eficazmente la actividad de la unión al ADN de mutantes de p53, así como su actividad de transactivador.

Más particularmente, el procedimiento de la invención utiliza ScFv capaces de unir específicamente un epítipo presente en la región C-terminal de p53, que soporta el dominio de oligomerización y el dominio de regulación. A este respecto, la presente solicitud de patente describe igualmente un ensayo que permite seleccionar los ScFv que poseen esta propiedad, por técnica ELISA.

Más preferentemente aún, los ScFv utilizados en el procedimiento de la invención son capaces de unirse específicamente a un epítipo presente en la región C-terminal de p53 comprendida entre los residuos 320-393. A este respecto, la solicitud de patente describe a título de ejemplo particular la construcción y la expresión del ScFv ScFv421 de secuencia SEQ ID n° 1 y del 11 D3 de secuencia SEQ ID n° 2.

El procedimiento de la invención es aplicable generalmente a las proteínas p53 mutadas que han perdido, totalmente o parcialmente, la capacidad de unirse al ADN, y el procedimiento de la invención permite restaurar esta capacidad. Más particularmente, el procedimiento de la invención es aplicable a las proteínas p53 mutadas que han perdido, totalmente o parcialmente, la función de factor de transcripción de p53 y permite restaurar esta función. El nivel de restauración puede ser total o parcial. Ventajosamente, es suficiente para permitir al mutante ejercer una función de supresor de tumor, por bloqueo del ciclo celular y/o por inducción de apoptosis. El procedimiento de la invención permite por lo tanto restaurar, al menos parcialmente, una actividad supresora de tumor en células que presentan proteínas p53 mutadas endógenas desprovistas de esta actividad. Ventajosamente, se trata de proteínas mutadas presentes en células tumorales. Como se ha indicado anteriormente, se han evidenciado diferentes formas mutadas de la proteína p53 en las células tumorales. Se puede citar por ejemplo las proteínas p53H273, p53W248 y p53G281. Los ejemplos presentados a continuación muestran en particular que el procedimiento de la invención permite modificar la conformación, y las propiedades biológicas de estos mutantes, *in vitro* e *in vivo*. En particular, estos ejemplos demuestran que los ScFv 421 y 11D3 son capaces de restaurar a los mutantes 273 y 248 la capacidad de unirse específicamente al ADN, y de inducir la transactivación dependiente de p53.

El procedimiento de la invención puede utilizarse *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. *In vitro* o *ex vivo* el procedimiento y las moléculas de la invención pueden permitir por ejemplo estudiar el mecanismo de acción de p53 y de sus formas

mutadas. Además, las moléculas de la invención pueden utilizarse para la detección o la purificación de proteínas p53, por ejemplo por acoplamiento sobre un soporte, puesta en contacto con una solución que contiene proteínas p53, seguida opcionalmente de una revelación de los complejos formados o de una elución. *In vivo*, principalmente en el ser humano, pueden permitir, en contextos patológicos tales como desórdenes hiperproliferantes en los que se observa una deficiencia en actividad p53, de restaurar esta función. A este respecto, se puede utilizar en asociación con otras aproximaciones evocadas anteriormente (introducción de un gen p53 natural) o igualmente en asociación con una quimioterapia (documento WO96/22101). Siempre *in vivo*, el procedimiento y las moléculas de la invención son utilizables en el animal, por ejemplo para determinar los niveles de expresión de los ScFv, y evaluar la posibilidad de una aproximación terapéutica humana.

Ventajosamente, la célula que presenta una proteína p53 mutada es una célula tumoral mamífera. A este respecto, se pueden citar más particularmente las células de los cánceres de pulmón (principalmente no el de células pequeñas), de colon, de hígado, de cerebro, cabeza o cuello y, más generalmente, todo cáncer en el que se observa una forma mutada de la proteína p53. Ventajosamente, se trata de una célula tumoral humana en la que se observa un mutante p53H273, p53W248 y/o p53G281 (pulmón, colon, cerebro, cabeza y cuello, hígado). La aplicabilidad del procedimiento de la invención a una célula particular puede determinarse fácilmente según la metodología siguiente: Primero la célula se caracteriza para la presencia de una proteína p53 mutada. Esta proteína se caracteriza luego para determinar la naturaleza de la mutación. Si se trata de una mutación conocida, y principalmente registrada anteriormente, la célula puede considerarse como susceptible de tratamiento para el procedimiento de la invención. Si se trata de una mutación no registrada, son posibles diferentes aproximaciones. La proteína mutada puede aislarse primeramente (o sintetizada artificialmente) y ensayada como se describe en los ejemplos para su comportamiento *in vitro* e *in vivo* en presencia de ScFv. Esto permite identificar el ScFv apropiado para restaurar las funciones deficientes de esta proteína. Otra aproximación consiste en ensayar directamente los ScFv sobre un cultivo de células, para determinar la eficacia biológica de los ScFv.

Para la realización del procedimiento de la invención, el ScFv se introduce ventajosamente en la célula, *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* en forma de un vector que lleva un ácido nucleico que codifica dicho ScFv bajo control de un promotor funcional en dicha célula.

El promotor se selecciona ventajosamente entre los promotores funcionales en las células de mamíferos, con preferencia humanas. Más preferentemente, se trata de un promotor que permite la expresión de un ácido nucleico en una célula hiperproliferante (cancerosa, restenosa, etc.). A este respecto, pueden utilizarse diferentes promotores. Puede tratarse por ejemplo del propio promotor del gen p53. Puede igualmente tratarse de regiones de origen diferente (responsables de la expresión de otras proteínas, o incluso sintéticas). Puede por lo tanto tratarse de cualquier promotor o secuencia derivada que estimule o que reprima la transcripción de un gen de manera específica o no, inducible o no, fuerte o débil. Se pueden citar principalmente las secuencias promotoras de genes eucariotas o víricos. Por ejemplo, puede tratarse de secuencias promotoras surgidas del genoma de la célula diana. Entre los promotores eucariotas, se pueden utilizar en particular promotores omnipresentes (promotor de los genes HPRT, PGK, α -actina, tubulina, etc.), promotores de filamentos intermedios (promotor de los genes GFAP, desmina, vimentina, neurofilamentos, queratina, etc.), promotores de genes terapéuticos (por ejemplo el promotor de los genes MDR, CFTR, Factor VIII, ApoAI, etc.), promotores específicos de tejidos (promotor del gen piruvato quinasa, villina, proteína intestinal de enlace de ácidos grasos, α -actina del músculo liso, etc.) o incluso promotores que responden a un estímulo (receptor de hormonas esteroideas, receptor del ácido retinoico, etc.). Incluso, puede tratarse de secuencias promotoras surgidas del genoma de un virus, tal como por ejemplo los promotores de los genes E1A y MLP de adenovirus, el promotor precoz del CMV, o incluso el promotor del LTR del RSV, etc. Además, estas regiones promotoras pueden ser modificadas por adición de secuencias de activación, de regulación, o que permitan una expresión específica para el tejido o mayoritaria.

Como se ha indicado anteriormente, la presente solicitud de patente describe igualmente nuevas moléculas que tienen propiedades de unión y de reversión de proteínas p53 mutadas, particularmente ventajosas. La invención describe más precisamente la construcción, la vectorización y la transferencia en las células de ScFv particulares (11D3, 421). La secuencia nucleica y peptídica de estos ScFv se indica como SEQ ID n° 1 y 2. Los ejemplos que siguen muestran la capacidad particularmente ventajosa de estas moléculas (i) de unirse específicamente a estas proteínas p53 mutadas, en la región C-terminal, (ii) de devolver a estas proteínas mutadas la capacidad de unirse al ADN, y (iii) de devolver a estas proteínas la capacidad de activar la transcripción. Los ejemplos muestran además que estas moléculas se expresan correctamente en las células tumorales, lo que permite su utilización ventajosa en contextos de desórdenes hiperproliferantes. Además, las propiedades de los ScFv de la invención pueden mejorarse igualmente. Principalmente, se conoce que la afinidad de los ScFv está influida en las regiones CDR (subrayadas en la secuencia) y pueden mejorarse por experimentos rutinarios de mutagénesis/selección. Así, la mutagénesis sobre anticuerpos ha sido descrita por ejemplo por Marks et coll. (Bio/Technology, 10, 779-783, 1992) y por Winter G. et Milstein C. (Nature, 349,293-299, 1991). Las tecnologías descritas en estas referencias pueden aplicarse a la preparación de variantes de los ScFv que tienen una afinidad modificada según la invención. La selección puede hacerse luego en las condiciones descritas en los ejemplos.

La invención tienen por lo tanto además por objetivo la molécula 11D3 cuya secuencia peptídica se presenta en SEQ ID n° 2, así como toda variante que presenta una modificación en las regiones CDR, que conserva la capacidad de unirse a las proteínas p53. La modificación puede consistir en una supresión, una sustitución o una inserción de uno o varios residuos en las regiones CDR. Ventajosamente, la modificación se lleva sobre menos de 10 residuos.

ES 2 297 853 T3

La presente invención tiene igualmente por objetivo cualquier ácido nucleico que codifique el ScFv 11D3 o una variante tal como se ha definido anteriormente.

El ácido nucleico según la invención puede ser un ácido ribonucleico (ARN) o desoxirribonucleico (ADN). Ventajosamente, se trata de un ADN complementario (ADNc). Puede ser de origen humano, animal, vírico, sintético o semisintético. Puede obtenerse de diferentes formas y principalmente mediante síntesis química utilizando las secuencias presentadas en la solicitud de patente y por ejemplo un sintetizador de ácidos nucleicos. Puede asimismo obtenerse por cribado de bancos mediante sondas específicas, principalmente tales como las descritas en la solicitud de patente. Puede incluso obtenerse por técnicas mixtas que incluyen la modificación química (alargamiento, supresión, sustitución, etc.) de secuencias cribadas a partir de bancos. De una manera general, los ácidos nucleicos de la invención pueden prepararse según toda técnica conocida por el experto en la técnica (véase principalmente las tecnologías descritas en las patentes US4 946 778 y WO94/02610. Una estrategia clásica de construcción de ácidos nucleicos que codifican un ScFv es la siguiente: Los ADNc que codifican las regiones VH y VL se obtienen a partir del hibridoma que produce el anticuerpo anti-p53 elegido. Para ello, los ARN totales del hibridoma se extraen y se someten a una reacción de transcripción inversa utilizando hexámeros aleatorios como cebadores. La utilización de este tipo de cebador permite evitar el empleo de cebadores específicos de inmunoglobulinas. Los clones de ADNc obtenidos tienen una longitud suficiente para clonar las regiones V. Cuando representan una fracción muy débil de ADNc totales presentes, se puede realizar una reacción previa de amplificación para producir suficiente ADN por el clonaje. Para ello, los ADNc codificantes de las regiones VH y VL se amplifican separadamente. Los cebadores utilizados son oligonucleótidos que hibridan a nivel de los extremos opuestos de las regiones variables de cada cadena (H y L). El producto de amplificación que utiliza cebadores específicos de cadenas pesadas y el producto de amplificación que utiliza los cebadores específicos de cadenas ligeras se purifican luego. Después de purificación, los ADNc que codifican las regiones VH y VL del anticuerpo se ensamblan en una cadena única por medio de un brazo nucleotídico (L). El brazo nucleotídico se ha construido de tal forma que uno de los extremos de una al extremo 3' del ADNc que codifica la región VH y el otro al extremo 5' del ADNc que codifica la región VL. La secuencia del brazo codifica el péptido (G4S)₃. La secuencia ensamblada, de 700 pb aproximadamente, contiene en forma de un fragmento Ncol-NotI, el encadenamiento VH-L-VL cuyas secuencias se representan como SEQ ID n° 1 y 2 por ejemplo.

Preferentemente, el ácido nucleico según la invención es un ADNc o un ARN.

El ácido nucleico según la invención se selecciona ventajosamente entre:

- (a) todo o parte de la secuencia SEQ ID n° 2 o de su hebra complementaria,
- (b) toda secuencia que hibrida con las secuencias (a) y que codifica un ScFv capaz de unir específicamente la proteína p53, preferentemente a nivel de la región C-terminal,
- (c) las variantes de (a) y (b) resultantes de la degeneración del código genético.

La presente invención se refiere igualmente a cualquier casete de expresión que comprenda un ácido nucleico tal como se ha definido anteriormente, un promotor que permita su expresión y una señal de terminación de la transcripción.

En el procedimiento de la invención, el ácido se introduce ventajosamente en las células por medio de un vector de administración, que permite mejorar (i) la eficacia de la penetración celular, (ii) el reconocimiento y/o (iii) la estabilidad extra- e intracelulares.

En un modo de realización particularmente preferido de la presente invención el ácido nucleico se incorpora en un vector que puede ser de origen químico (liposoma, nanopartícula, complejo peptídico, lípidos o polímeros catiónicos, etc) viral (retrovirus, Adenovirus, virus del herpes, AAV, virus de la viruela, etc) o plasmídico.

La utilización de vectores virales se basa en las propiedades naturales de transfección de los virus. Por consiguiente es posible utilizar por ejemplo adenovirus, los virus del herpes, retrovirus y virus adenoasociados. Estos vectores demuestran particularmente rendimientos en el plano de la transfección.

En particular, la capacidad de los adenovirus y de los retrovirus para infectar las células tumorales hace de los vectores la elección dentro del marco de la invención. A este respecto, en un modo preferido de la realización de la invención, el ácido nucleico se introduce en forma de un vector retroviral, es decir de un retrovirus recombinante defectivo cuyo genoma comprende un ácido nucleico que codifica un ScFv tal como se ha definido anteriormente. En otro modo preferido de la realización de la invención, el ácido nucleico se introduce en forma de un vector adenoviral, es decir de un adenovirus recombinante defectivo cuyo genoma comprende un ácido nucleico que codifica un ScFv tal como se ha definido anteriormente.

El vector según la invención puede asimismo ser un agente no viral capaz de activar la transferencia y la expresión de ácidos nucleicos en células eucariotas. Los vectores químicos o bioquímicos, sintéticos o naturales, representan una alternativa interesante a los virus naturales en particular por razones de comodidad, de seguridad y asimismo por ausencia de límite teórico en lo que se refiere las dimensiones del ADN que se ha de transfectar. Estos vectores sintéticos tienen dos funciones principales, compactar el ácido nucleico a transfectar y facilitar su fijación celular

ES 2 297 853 T3

así como su paso a través de la membrana plasmática y, dado el caso, las dos membranas nucleares. Para paliar la naturaleza polianiónica de los ácidos nucleicos, los vectores no virales poseen todas las cargas policatiónicas. En un procedimiento particular según la invención, el vector es un vector químico o bioquímico.

5 La invención se refiere igualmente a cualquier composición farmacéutica que comprende al menos un ácido nucleico tal como se ha definido anteriormente.

Se refiere igualmente a cualquier composición que comprende al menos un vector tal como se ha definido anteriormente.

10 Se refiere también a cualquier composición que comprende al menos un ScFv tal como se ha definido anteriormente.

15 Se refiere igualmente a composiciones que comprenden un ácido nucleico o un vector tal como se ha definido anteriormente y un ácido nucleico o un vector que codifica p53 natural, para una utilización combinada simultánea o espaciada en el tiempo.

20 A causa de sus propiedades antiproliferantes, las composiciones farmacéuticas según la invención están muy particularmente adaptadas para el tratamiento de los trastornos hiperproliferantes, tales como principalmente los cánceres y la restenosis. La presente invención proporciona por consiguiente un método particularmente eficaz para la destrucción de células, principalmente de células hiperproliferantes.

25 La invención puede ser utilizada *in vitro* o *ex vivo*. En este caso, la invención consiste esencialmente en incubar las células en presencia de uno o varios ácidos nucleicos (o de un vector, o casete o directamente de ScFv). Se pueden utilizar dosis de 0,01 a 1000 μg de vector por 10^6 células, o una MOI de 0,1 a 1000 para un vector viral.

30 *In vivo*, la invención consiste en administrar al organismo una cantidad activa de un vector (o de un casete) según la invención, preferentemente directamente en la zona a tratar (tumor principalmente). A este respecto, la invención tiene por objeto igualmente un método de destrucción de células hiperproliferantes que comprende la puesta en contacto de dichas células o de una parte de entre ellas con un ácido nucleico tal como el definido anteriormente. Para una utilización *in vivo*, el ácido nucleico o el vector utilizado en la presente invención puede formularse en vista de las administraciones por vía tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular, transdérmica, etc. Preferentemente, el ácido nucleico o el vector se utiliza en forma inyectable. Puede por lo tanto mezclarse con cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable para una formulación inyectable, principalmente para una inyección directa en la zona que debe tratarse. Puede tratarse en particular de soluciones estériles, isotónicas, o de composiciones secas, principalmente liofilizadas, que, por adición según el caso de agua esterilizada o de suero fisiológico, permiten la constitución de solutos inyectables. Una inyección directa de ácido nucleico en el tumor del paciente es interesante ya que permite concentrar el efecto terapéutico en los tejidos afectados. Las dosis de ácido nucleico utilizadas pueden adaptarse en función de diferentes parámetros, y principalmente en función del gen, del vector, del modo de administración utilizado, de la patología concerniente o incluso de la duración del tratamiento buscado. Ventajosamente, las dosis administradas *in vivo* están comprendidas entre 10^6 y 10^{10} pfu para un vector viral tal como un adenovirus. Además, se pueden pretender igualmente administraciones repetidas.

45 Siempre *in vivo*, el procedimiento y las moléculas de la invención pueden utilizarse para estudiar los mecanismos de acción de p53, y para determinar el potencial de los ScFv sobre modelos animales.

50 La presente invención se utiliza ventajosamente *in vivo* para la destrucción de células en hiperproliferación (es decir, en proliferación anormal). Por consiguiente es aplicable a la destrucción de células tumorales o de células de músculo liso de la pared vascular (restenosis). Es muy particularmente apropiada al tratamiento de cánceres en los que se observa un mutante de p53. A modo de ejemplo, se pueden citar los adenocarcinomas de colon, los cánceres de tiroides, los carcinomas de pulmón, las leucemias mieloides, los cánceres colorrectales, los cánceres de mama, los cánceres de pulmón, los cánceres gástricos, los cánceres de esófago, los linfomas B, los cánceres de ovario, los cánceres de vejiga, los glioblastomas, los hepatocarcinomas, los cánceres de huesos, de piel, de páncreas o incluso los cánceres de riñón y de próstata, los cánceres de esófago, los cánceres de laringe, los cánceres de cabeza y cuello, los cánceres anogenitales positivos al HPV, los cánceres de nasofaringe positivos a EBV, los cánceres en los que se sobreexpresa la proteína celular mdm2, etc.

60 La presente invención se describe con más detalle en los ejemplos que siguen, que deben ser considerados como ilustrativos y no limitativos.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Estrategia de cribado de anticuerpos

65 Figura 2: Evidencia de la capacidad de los anticuerpos a inducir un retardo en el gel de p53.

Figura 3: Evidencia de la capacidad de los anticuerpos a inducir un retardo sobre el gel de p53H273.

ES 2 297 853 T3

Figura 4: Evidencia por ELISA de la asociación de los ScFv con p53 natural. Círculos rellenos: IgG 11 D3 (1 $\mu\text{g/ml}$ al principio); Círculos vacíos: IgG 421 D3 (1 $\mu\text{g/ml}$ al principio); Cuadrados: suero policlonal biotinilado (1 $\mu\text{g/ml}$ al principio); Triángulos llenos: ScFv 11 D3-myc (al $\frac{1}{2}$ al principio); Triángulos vacíos: ScFv 421-myc (al $\frac{1}{2}$ al principio); Rombos: ScFv irrelevante (anti-CD3, al $\frac{1}{2}$ al principio).

Figura 5: Evidencia de los retardos en gel inducidos por los ScFv

Figura 6: Restauración de la actividad de la unión al ADN a mutantes de p53.

Figura 7: Expresión del ScFv421 en células H1299

Figura 8: Restauración de la actividad de transcripción del mutante H273 en la línea H358.

Figura 9: Restauración de la actividad de transcripción del mutante H273 endógeno en la línea HT29.

Ejemplos

Ejemplo 1

Obtención y cribado del anticuerpo 11D3

Este ejemplo describe la preparación, la obtención y la selección de anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra la proteína p53, capaces de activar la función de unión al ADN de las formas mutadas de p53.

1.1. Obtención de las proteínas utilizadas durante la inmunización de los ratones y el cribado de los hibridomas

La proteína p53 natural y diferentes proteínas p53 H273, p53 W248, p53 G281 que corresponden a mutaciones de la p53 natural frecuentemente encontradas en células tumorales se han introducido en células de insectos *Spodoptera frugiperda* Sf9 infectados por un baculovirus recombinante y purificadas por afinidad sobre un gel de agarosa sobre el que se ha acoplado el anticuerpo policlonal PAb421 (Leveillard *et al.*, EMBO J. 15, 1615-1623 (1996)). Las proteínas que corresponden a los fragmentos 1-320 y 73-320 de la proteína p53 natural se han producido igualmente en células de insectos *Spodoptera frugiperda* Sf9 infectados por un baculovirus recombinante siguiendo las instrucciones dadas por la Sociedad Invitrogen. Los ADN complementarios insertados en el plásmido de transferencia pBlueBacIII se han generado por técnicas clásicas del ADN recombinante descritas por ejemplo por Sambrook *et al.* (Sambrook, Fritsch & Maniatis: Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edition, 1989, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory).

1.2. Obtención y cribado de hibridomas

Los ratones se inmunizaron con una mezcla equimolar de tres proteínas mutantes de p53 descritas anteriormente y los hibridomas se obtuvieron siguiendo los protocolos operatorios descritos por Harlow et Lane (Harlow & Lane: Antibodies, a laboratory manual, 1988, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory). La selección de los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas mutantes de p53 descritas anteriormente se ha realizado por el método de captura del anticuerpo producido en el medio de cultivo del hibridoma en los pocillos de placas de 96 pocillos en PVC en los que se ha inmovilizado previamente una cantidad de 1 microgramo de la mezcla equimolar de tres proteínas mutantes de p53 descritas anteriormente siguiendo los protocolos operatorios descritos por Harlow et Lane (Harlow & Lane: Antibodies, a laboratory manual, 1988, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory). Este primer cribado ha permitido seleccionar 317 hibridomas positivos. Después de dos semanas de amplificación de los hibridomas, los sobrenadantes de los hibridomas amplificados se han reevaluados en un primer momento por el método (método 1) de captura del anticuerpo mencionado anteriormente luego clasificado utilizando tres métodos de cribado idénticos en el principio al mencionado anteriormente salvo que la naturaleza de las proteínas inmovilizadas eran diferentes: en los pocillos estaban inmovilizadas bien (método 2) la proteína p53 natural purificada, bien (método 3) un extracto protéico de células Sf9 que producen el fragmento 1-320 de la p53 natural, bien (método 4) un extracto protéico de células Sf9 que producen el fragmento 73-393 de la p53 natural. Los extractos protéicos se han obtenido por lisis por congelaciones/descongelaciones en un tampón fosfato de las células Sf9 luego ultracentrifugación de los desechos celulares. Sobre los 317 sobrenadantes de hibridomas amplificados, 162 no respondían más en el método 1. Los 155 restantes eran todos positivos al método 2. entre estos, 33 (grupo A) daban negativo en el método 3 y 4, 115 (Grupo B) eran positivos en el método 3 y negativos en el método 4, y finalmente 7 (grupo C) daban positivo en los dos métodos. Los sobrenadantes del grupo B corresponden a los sobrenadantes que contienen un anticuerpo cuyo epítipo se sitúa en los 73 primeros aminoácidos de p53. 77 sobrenadantes de este grupo resultaron dar negativo en el método 2 cuando eran preincubados con el péptido (1 mg/ml) correspondiente a la secuencia de los 40 primeros aminoácidos de p53. Un isotipado de los anticuerpos del grupo A, de los 38 anticuerpos del grupo B que quedan después de eliminación de los 77 mencionados anteriormente y de los del grupo C nos ha permitido eliminar los IgM. Estos resultados se recapitulan en la Figura 1.

42 anticuerpos se ensayaron luego para su capacidad para inducir un superretardo sobre un complejo p53/DNA. Después de la purificación sobre proteína A/Sefarosa, se cuantificaron los anticuerpos. Se realizaron experimentos de retardo en gel incubando 30 ng de proteína p53 de tipo natural purificada con una sonda de ADN marcada en el 32P

ES 2 297 853 T3

que representa una secuencia de fijación específica de p53. Se añadieron 300 ng de los diferentes anticuerpos. Los complejos se resolvieron sobre gel de acrilamida.

5 Los resultados de la Figura 2 muestran que 27 de estos anticuerpos eran capaces de inducir un superretardo. 19 de entre estos 27 se ensayaron sustituyendo el mutante His273 en la proteína p53. natural en el mismo experimento de retardo en gel.(Figura 3). Estos 19 anticuerpos dieron todos resultados positivos. El anticuerpo nº 26 presentaba un retardo más pronunciado que los otros. Este anticuerpo se designó 11 D3 y se utilizó a lo largo de los experimentos.

Ejemplo 2

10

Obtención de los ScFvs 421 y D3M

Los ScFvs se obtuvieron a partir de los hibridomas por técnicas clásicas de biología molecular basadas en PCR con ayuda de cebadores específicos de las regiones VH y VL. El ScFv derivado del anticuerpo 11D3 se designó D3M. 15 Su secuencia está representada por la SEQ ID nº 2. La secuencia de ScFv421 está representada por la SEQ ID nº 1.

Ejemplo 3

20

Construcción de los vectores de expresión de los ScFv

Este ejemplo describe la construcción de vectores utilizables para la transferencia de los ácidos nucleicos de la invención *in vitro* o *in vivo*.

25

3.1. Construcción de vectores plasmídicos

Para la construcción de vectores plasmídicos se han utilizado 2 tipos de vectores.

30

- El vector pSV2, está descrito en ADN Cloning, A practical approach vol. 2, D.M. Glover (Ed) IRL Press, Oxford, Washington DC, 1985. Este vector es un vector de expresión eucariota. Los ácidos nucleicos que codifican los ScFv se han insertado en este vector en forma de fragmentos HpaI-EcoRV. Están por consiguiente colocados bajo el control del promotor del potenciador del virus SV40. Todas las construcciones descritas en el ejemplo 2 se han introducido en este vector para ser ensayadas en los diferentes sistemas de evaluación *in vitro* e *in vivo*.

35

- Vector pCADN3 (Invitrogen). Se trata asimismo de un vector de expresión eucariota. Los ácidos nucleicos que codifican los ScFv de la invención están por consiguiente colocados, en este vector, bajo el control del promotor precoz del CMV. Todas las construcciones descritas en el ejemplo 2 se han introducido en este vector en forma de un fragmento Hind III/Not I.

40

3.2. Construcción de vectores virales

Según un modo concreto, la invención se basa en la construcción y utilización de vectores virales que permiten la transferencia y la expresión *in vivo* de ácidos nucleicos tales como los definidos anteriormente.

45

Tratándose más concretamente de adenovirus, se han caracterizado diferentes serotipos, cuya estructura y propiedades varían un poco. Entre estos serotipos, se prefiere utilizar en el marco de la presente invención los adenovirus humanos de tipo 2 ó 5 (Ad 2 o Ad 5) o los adenovirus de origen animal (véase la solicitud de patente WO 94/26914). Entre los adenovirus de origen animal utilizables en el marco de la presente invención se pueden citar los adenovirus de origen canino, bovino, murino, (ejemplo: Mav1, Beard *et al.*, *Virology* 75 (1990) 81), ovino, porcino, aviar o incluso de simio (ejemplo: SAV). Preferentemente, el adenovirus de origen animal es un adenovirus canino, más preferentemente un adenovirus CAV2 [cepa manhattan o A26/61 (ATCC VR-800) por ejemplo]. Con preferencia, se utiliza en el marco de la invención adenovirus de origen humano o canino o mixto.

55

Preferentemente, los adenovirus defectivos de la invención comprenden los ITR, una secuencia que permite la encapsulación y un ácido nucleico según la invención. Aún más preferentemente, en el genoma de los adenovirus de la invención, la región E1 al menos no es operativa. El gen viral considerado puede hacerse no operativo para cualquier técnica conocida por el experto en la materia, y principalmente por supresión total, sustitución, supresión parcial, o adición de una o varias bases en el o los genes considerados. Dichas modificaciones pueden obtenerse *in vitro* (en el ADN aislado) o *in situ*, por ejemplo, mediante las técnicas de la ingeniería genética, o incluso por tratamiento mediante agentes mutágenos. Se pueden modificar igualmente otras regiones, y principalmente la región E3 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697, WO96/22378) y L5 (WO95/02697). Según un modo preferido de puesta en práctica, el adenovirus según la invención comprende una supresión en las regiones E1 y E4. Según otro modo de realización preferida, comprende una supresión en la región E1 en la que están insertados la región E4 y el ácido nucleico de la invención (véase el documento WO96/13596). En los virus de la invención, la supresión en la región E1 se extiende preferentemente desde los nucleótidos 455 a 3329 en la secuencia del adenovirus Ad5.

65

Los adenovirus recombinantes defectivos según la invención pueden prepararse por cualquier técnica conocida por los expertos en la materia (Levrero *et al.*, *Gene* 101 (1991) 195, patente EP 185 573; Graham, *EMBO J.* 3 (1984) 2917). En particular, pueden prepararse por recombinación homóloga entre un adenovirus y un plásmido que lleva entre otras

la secuencia del ADN de interés. La recombinación homóloga se produce después de la transfección conjunta de dichos adenovirus y plásmido en una línea celular apropiada. La línea celular utilizada debe preferentemente (i) ser transformable por dichos elementos, y (ii), comprender las secuencias capaces de complementar la parte del genoma del adenovirus defectivo, preferentemente en forma integrada para evitar los riesgos de recombinación. A modo de ejemplo de línea, se puede mencionar la línea de riñón embrionario humano 293 (Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) que contiene principalmente, integrada en su genoma, la parte izquierda del genoma de un adenovirus Ad5 (12%) o las líneas capaces de complementar las funciones E1 y E4 tales como las descritas principalmente en las solicitudes de patente n° WO 94/26914, WO 95/02697 y WO96/22378.

A continuación, los adenovirus que se han multiplicado se recuperan y purifican según las técnicas clásicas de biología molecular, como se ilustra en los ejemplares.

En lo que se refiere a los virus adeno-asociados (AAV), se trata de virus con un ADN de un tamaño relativamente reducido, que se integra en el genoma de las células que infectan, de manera estable y específica de la zona. Son capaces de infectar un amplio espectro de células, sin inducir un efecto sobre el crecimiento, morfología o diferenciación celular. Por otro lado, no parece que estén implicados en las patologías del ser humano. El genoma de los AAV se ha clonado, secuenciado y caracterizado. Comprende aproximadamente 4700 bases, y contiene en cada extremo una región repetida invertida (ITR) de aproximadamente 145 bases, que sirve de origen de replicación para el virus. El resto del genoma está dividido en 2 regiones esenciales en las que se encuentran las funciones de encapsidación: la parte izquierda del genoma, que contiene el gen rep implicado en la replicación viral y la expresión de los genes virales; la parte derecha del genoma, que contiene el gen cap que codifica las proteínas de la cápside del virus.

En la bibliografía se ha descrito la utilización de los vectores obtenidos a partir de los AAV para la transferencia de genes *in vitro* e *in vivo* (véanse principalmente los documentos WO 91/18088; WO 93/09239; US 4.797.368, US 5.139.941, EP 488 528). Estas solicitudes de patente describen diferentes construcciones procedentes de los AAV, en las que los genes rep y/o cap son eliminados y sustituidos por un gen de interés, y su utilización para transferir *in vitro* (en células en cultivo) o *in vivo* (directamente en un organismo) dicho gen de interés. Los AAV recombinantes defectivos según la invención pueden prepararse mediante co-transfección, en una línea celular infectada con un virus auxiliar humano (por ejemplo un adenovirus), de un plásmido que contiene una secuencia nucleica de la invención de interés flanqueada por dos regiones repetidas invertidas (ITR) de AAV, y de un plásmido que lleva los genes de encapsidación (genes rep y cap) de AAV. Una línea celular utilizable es por ejemplo la línea 293. Los AAV recombinantes producidos se purifican a continuación mediante las técnicas clásicas.

Respecto a los virus del herpes y los retrovirus, la construcción de vectores recombinantes se ha descrito extensamente en la bibliografía: véanse principalmente Breakfield *et al.*, *New Biologist* 3 (1991) 203; EP 453242, EP178220, Bernstein *et al.* Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, *BioTechnology* 3 (1985) 689, etc. En particular, los retrovirus son virus integradores, que infectan selectivamente las células en división. Constituyen por lo tanto vectores de interés para aplicaciones en cáncer. El genoma de los retrovirus comprende esencialmente dos LTR, una secuencia de encapsidación y tres regiones codificadoras (gag, pol y env). En los vectores recombinantes obtenidos a partir de los retrovirus, generalmente los genes gag, pol y env se eliminan, total o parcialmente, y se sustituyen por una secuencia de ácido nucleico heterólogo de interés. Estos vectores pueden realizarse a partir de diferentes tipos de retrovirus tales como principalmente el MoMuLV (“virus de la leucemia murino de Moloney”; aún denominado MoMLV), MSV (“virus del sarcoma murino de Moloney”), HaSV (“virus del sarcoma de Harvey”); SNV (“virus de la necrosis del bazo”); RSV (“virus del sarcoma de Rous”) o virus de Friend.

Para construir retrovirus recombinantes según la invención que comprenden un ácido nucleico según la invención, se construye un plásmido que comprende principalmente las LTR, la secuencia de encapsidación y dicho ácido nucleico, después se utiliza para transfectar una línea celular denominada de encapsidación, capaz de aportar en trans las funciones retrovirales insuficientes en el plásmido. Generalmente, las líneas de encapsidación son por lo tanto capaces de expresar los genes gag, pol y env. Tales líneas de encapsidación han sido descritas en la técnica anterior, y principalmente la línea PA317 (documento de patente US 4.861.719); la línea PsiCRIP (documento de patente WO 90/02806) y la línea GP+envAm-12 (documento de patente WO 89/07150). Por otro lado, los retrovirus recombinantes pueden contener modificaciones a nivel de las LTR para suprimir la actividad de la transcripción, así como secuencias amplias de encapsidación, que contienen una parte del gen gag (Bender *et al.*, *J. Virol.* 61 (1987) 1639). Los retrovirus recombinantes producidos se purifican luego mediante las técnicas clásicas.

Para la puesta en práctica de la presente invención, es particularmente ventajoso utilizar un adenovirus o un retrovirus recombinante defectivo. Estos vectores poseen en efecto propiedades particularmente interesantes para la transferencia de genes en las células tumorales.

3.3. Vectores químicos

Entre los vectores sintéticos desarrollados, se prefiere utilizar en el marco de la invención polímeros catiónicos de tipo polilisina, (LKLK)_n, (LKKL)_n (documento WO95/21931), polietileno imina (documento WO96/02655) y DEAE dextrano o también los lípidos catiónicos o agentes de transfección. Ellos poseen la propiedad de condensar el ADN y de favorecer su asociación con la membrana celular. Entre estos últimos, se pueden citar las lipopoliaminas (lipofectamina, transfectam, documento WO95/18863, documento WO96/17823) diferentes lípidos catiónicos o neutros (DOTMA, DOGS, DOPE, etc) así como péptidos de origen nuclear (documento WO96/25508). Además, el concepto

ES 2 297 853 T3

de la transfección reconocida se ha desarrollado, mediada por un receptor, que aprovecha el principio de condensar el ADN gracias al polímero catiónico dirigiendo la fijación del complejo a la membrana gracias a un acoplamiento químico entre el polímero catiónico y el ligando de un receptor de la membrana, presente en la superficie del tipo celular que se quiere injertar. El reconocimiento del receptor a la transferrina, a la insulina o del receptor de las asialoglucoproteínas de los hepatocitos se ha descrito por consiguiente. La preparación de una composición según la invención utilizando dicho vector químico se realiza según cualquier técnica conocida por el experto en la materia, generalmente mediante una simple puesta en contacto de los diferentes compuestos.

Ejemplo 4

Los scFvs reconocen p53

La asociación de los ScFvs con p53 se verificó en el ensayo ELISA.

Un tag myc se fusionó con los scFvs para permitir su detección. Los ScFvs 421, 11 D3 (D3M) y un ScFv control (anti-CD3) se introdujeron a partir de periplasmas de bacterias que expresan estos diferentes ScFvs.

Se incubaron placas ELISA revestidas con ayuda de p53 purificada con diferentes diluciones del IgG 11 D3, IgG 421, un suero policlonal biotinilado anti p53, el scFv 11 D3, el ScFv 421 y el ScFv anti-CD3.

Los dos IgG se revelaron luego con un anticuerpo secundario anti IgG acoplado a la fosfatasa alcalina. El suero biotinilado se reveló con extravidina acoplada a la fosfatasa alcalina. Los scFvs se revelaron con el anticuerpo 9E10 anti-myc, luego con un anticuerpo anti IgG acoplado a la fosfatasa alcalina. Una valoración colorimétrica de la actividad fosfatasa alcalina está representada en la figura 4, indicando que las dos IgG purificadas, el suero policlonal y los ScFvs 421 y 11D3 reconocen p53 mientras que el ScFv anti-CD3 es inactivo.

Ejemplo 5

Los ScFvs son capaces de inducir un superretardo en la p53 natural

La capacidad de los ScFvs para activar la función de unión al ADN de la p53 natural se ensayó con experimentos de retardo en gel.

Un duplex de ADN que representa un sitio de fijación específico de p53 se marcó en el 32P luego se incubó con la p53 natural purificada y diferentes anticuerpos purificados o ScFvs producidos en periplasmas bacterianos. Los complejos se resolvieron por electroforesis sobre gel de acrilamida.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 5.

El complejo ADN/p53 se observó en la línea "Basal". Los anticuerpos HR231, pAb421 y 11D3 son capaces de inducir un retardo suplementario (supershift o superretardo) y aumentar la cantidad de complejo ADN/p53.

Los ScFvs 421 y D3M son capaces igualmente de inducir un superretardo mientras que un ScFv control anti-rata (Y28) es silencioso. El ScFv421, contrariamente al ScFv D3M induce un aumento de la cantidad de complejo p53/ADN.

Ejemplo 6

Los scFvs son capaces de restaurar una función de unión al ADN a un mutante de p53

De manera análoga, los ScFvs se ensayaron por su capacidad para restaurar la función de unión al ADN del mutante Trp248 inactivo. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 6.

Muestran que los dos ScFvs inducen la aparición de una banda retardada que corresponde a un complejo p53/ADN.

Ejemplo 7

Los ScFvs se expresan correctamente en células tumorales

La expresión de los ScFvs se verificó por transfección transitoria de vectores de expresión (promotor de SV40) en células tumorales H1299. Más particularmente, los ácidos nucleicos se administraron en forma de un vector plasmídico de tipo pSV2 (ejemplo 3), en presencia de un lípido catiónico, la lipofectamina.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 7. Por Western blot sobre un extracto total, se observó una banda mayoritaria que migraba hacia los 30kD, que correspondía al tamaño esperado y confirmaba que las moléculas se expresan en niveles significativos en las células tumorales.

ES 2 297 853 T3

Ejemplo 8

Los ScFvs son capaces de restaurar parcialmente la función transactivadora de los mutantes His273

5 La funcionalidad de estos ScFvs en el seno de células tumorales sobre la función transactivadora deficiente de las formas mutadas de p53 se midió de la manera siguiente:

10 Se realizaron transfecciones transitorias en líneas H358 o H1299 (las dos eliminadas para p53) o en la línea HT29 (que comprende el mutante p53 His 273). Estas transfecciones introducían vectores de expresión para la p53 de tipo natural o los mutantes H273 o His175, para los dos ScFvs y un plásmido transportador que comprende el gen CAT (clorofanfenicol-acetiltransferasa) bajo el control de un promotor dependiente de p53. La actividad CAT medida 48h después de transfección es el reflejo de la función transactivadora de p53.

15 Los resultados de la figura 8 indican que en la línea H358, los dos ScFvs son capaces de reactivar de manera significativa la actividad de transcripción del mutante His273. Se obtuvieron resultados idénticos en la línea H 1299.

Igualmente, en la línea HT29, los dos ScFvs son capaces de aumentar la actividad de transcripción del mutante His273 endógeno (Figura 9).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de un anticuerpo de cadena simple capaz de unirse específicamente a un epítoto presente en la región C-terminal de p53 comprendida entre los residuos 320-393 para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de cánceres en los que está implicada una proteína p53 mutada.

2. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque el anticuerpo de cadena simple se elige entre el ScFv421 de secuencia SEQ ID N° 1 y el 11D3 de secuencia SEQ ID N° 2.

10 3. Utilización de un ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cadena simple capaz de unirse específicamente a un epítoto presente en la región C-terminal de p53 comprendida entre los residuos 320-393 para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de cánceres en los que está implicada una proteína p53 mutada.

15 4. Utilización según la reivindicación 3, **caracterizada** porque el ácido nucleico que codifica un anticuerpo de cadena simple se elige entre el ScFv421 de secuencia SEQ ID N° 1 y el 11D3 de secuencia SEQ ID N° 2.

5. Utilización según la reivindicación 4, **caracterizada** porque el ácido nucleico forma parte de un vector.

20 6. Utilización según la reivindicación 5, **caracterizada** porque el vector es un vector viral.

7. Utilización según la reivindicación 6, **caracterizada** porque el vector es un adenovirus recombinante defectivo.

8. Utilización según la reivindicación 6, **caracterizada** porque el vector es un retrovirus recombinante defectivo.

25 9. Utilización según la reivindicación 6, **caracterizada** porque el vector es un AAV recombinante defectivo.

10. Utilización según la reivindicación 6, **caracterizada** porque el vector es un HSV recombinante defectivo.

30 11. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizada** por que el cáncer es un cáncer de pulmón, de colon, cabeza y cuello, hepático, de cerebro.

12. Utilización según una de las reivindicaciones 1 ó 3, **caracterizada** por que la proteína p53 mutada se elige entre las proteínas p53H273, p53W248 y p53G281.

35 13. La molécula 11D3 tal como se representa en la secuencia SEQ ID N° 2.

14. Acido nucleico que codifica una molécula según la reivindicación 13.

40 15. Acido nucleico según la reivindicación 14 **caracterizado** por la secuencia SEQ ID N° 2.

16. Composición que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 15.

17. Composición que comprende una molécula según la reivindicación 13.

45 18. Composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento de los cánceres.

50

55

60

65

CRIBADOS SECUNDARIOS

→ **Mapa N-terminal / central / C-terminal**

ELISA 1-320 / 73-320

WT	-	+	+	+
1-320	-	-	+	+
73-320	-	-	-	+
	perdus	C-ter	N-ter	central
	162	33	115	7

→ **Selección de anticuerpos N-terminales**

ELISA WT + desplazamiento por péptidos 1-40 / 34-73

77 anticuerpos desplazados por 1-40

27 anticuerpos desplazados por 34-73

11 anticuerpos no desplazados

→ **Eliminación de IgM**

Tipificación

Figura 1

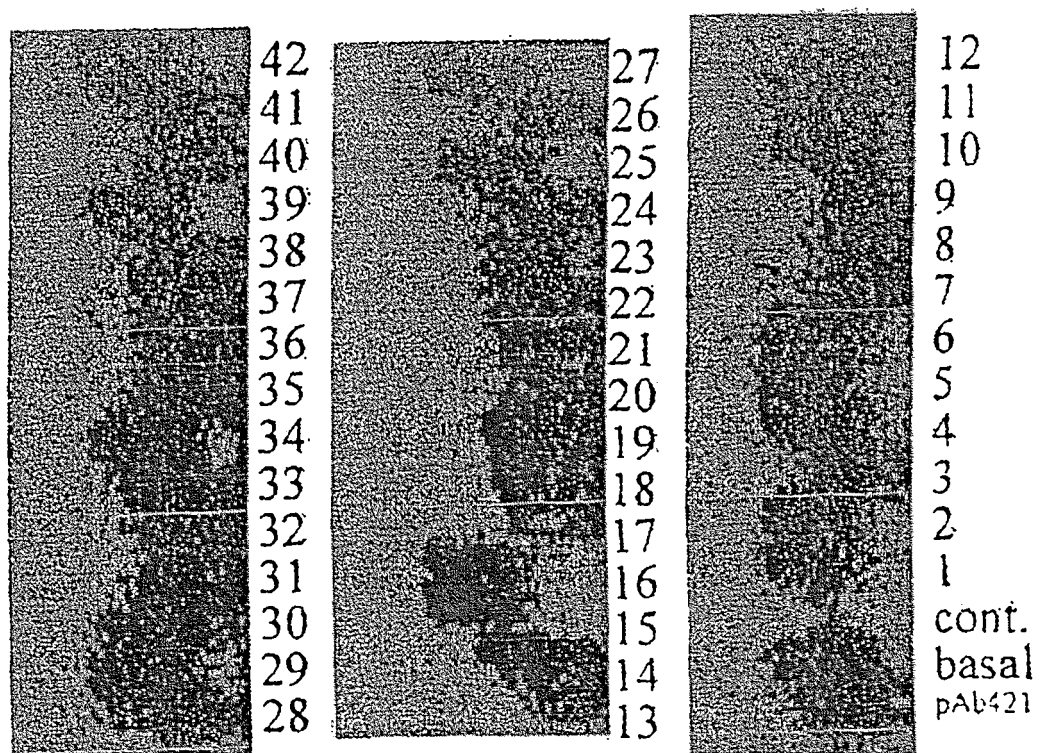


Figura 2

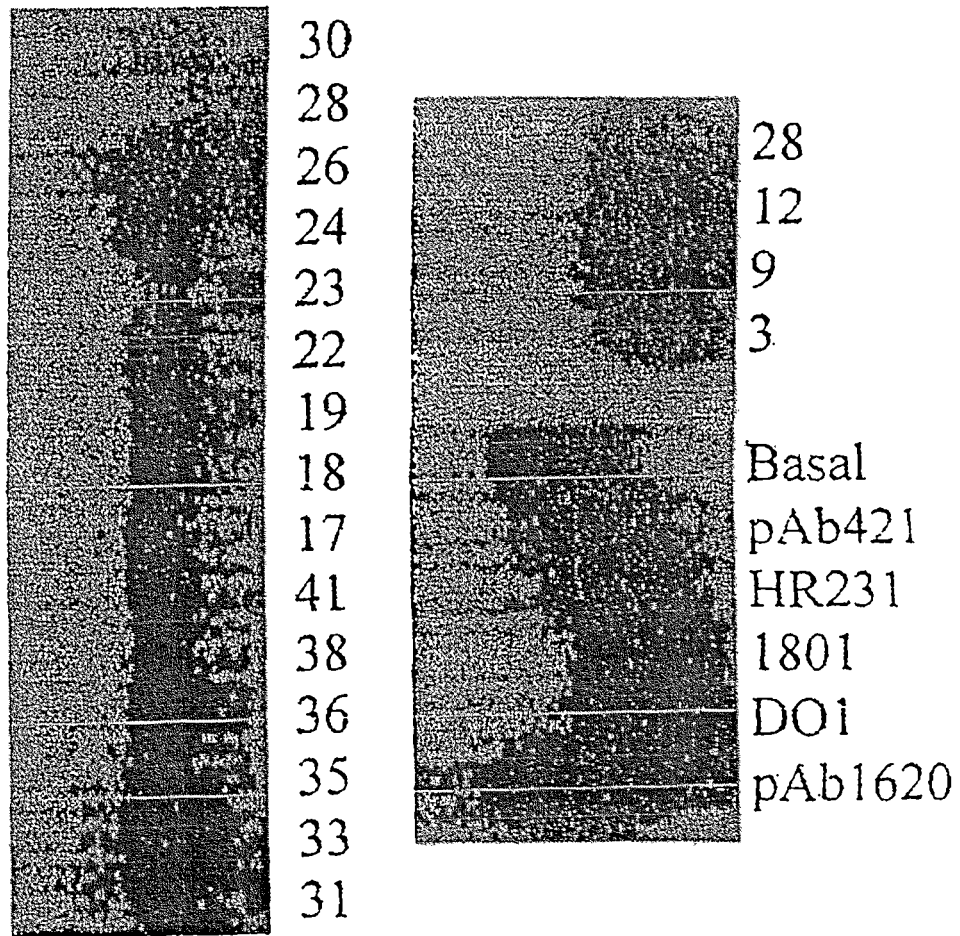


Figura 3

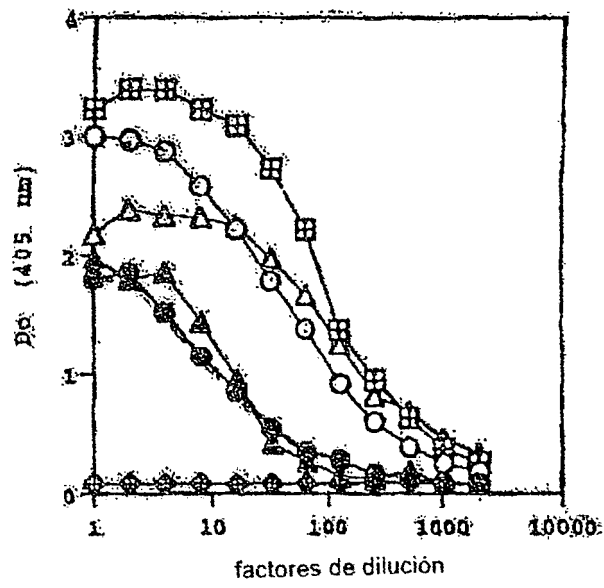
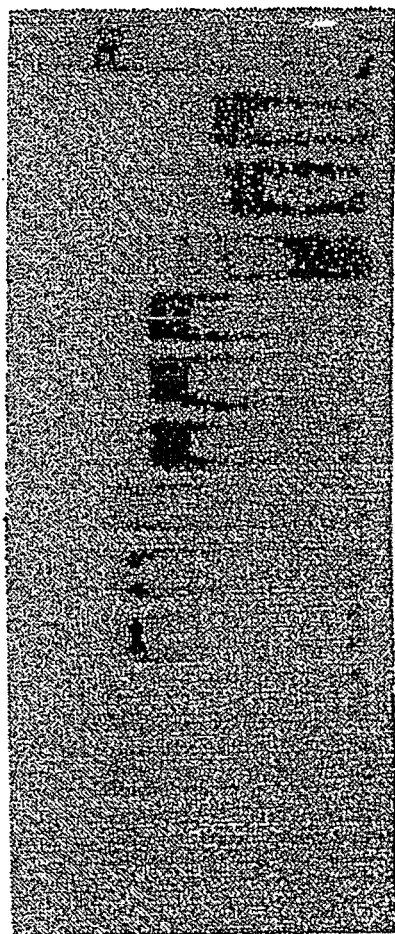


Figura 4



- Basal
- + HR231
- + pAb421
- + 11D3
- + ScFv421 (2)
- + ScFv421 (5)
- + ScFv421 (10)
- + ScFvD3M (2)
- + ScFvD3M (5)
- + ScFvD3M (10)
- + ScFvY28 (2)
- + ScFvY28 (5)
- + ScFvY28 (10)

Figura 5

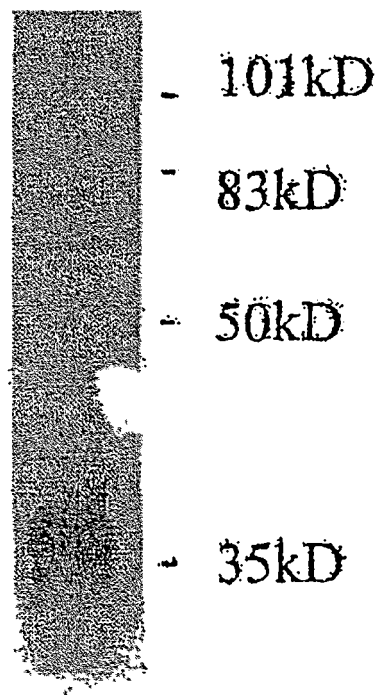


Figura 7

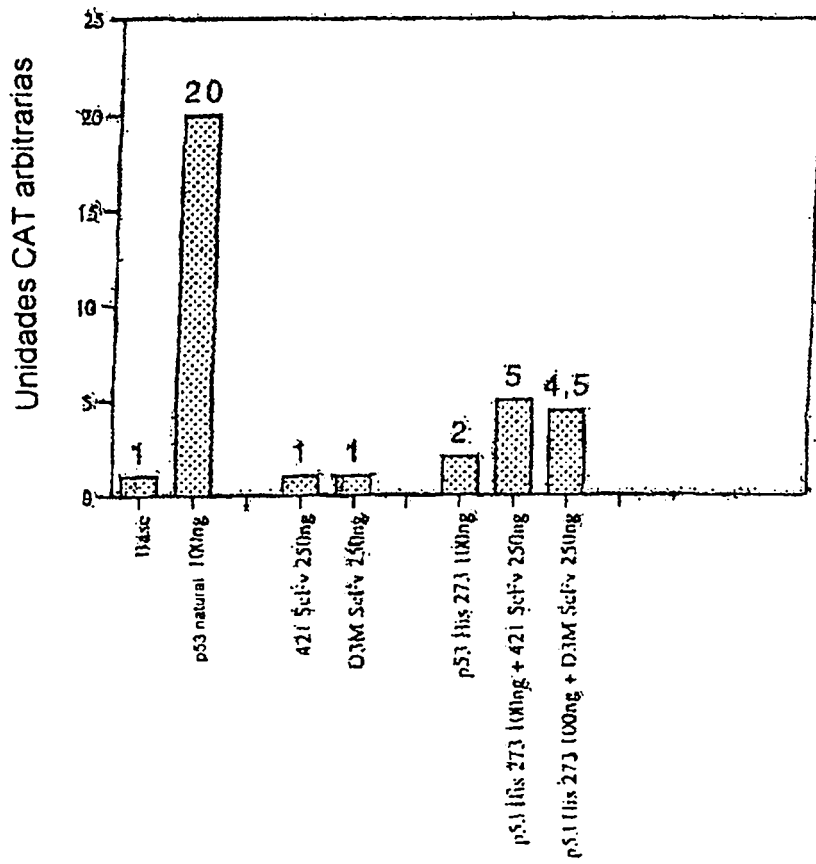


Figura 8

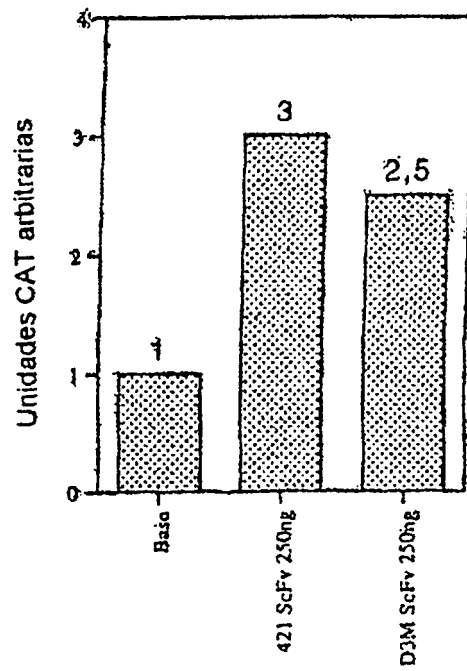


Figura 9

ES 2 297 853 T3

LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID nº 1: Secuencias nucleotídica y peptídico de 421

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

1/1                               31/11
CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCT GGG GCA GAG CTT GTG AGG TCA GGG GCC TCA GTC AAG TTG
gln val gln leu gln gln ser gly ala glu leu val arg ser gly ala ser val lys leu
61/21                               91/31
TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC TAC TAT ATG CAC TGG GTG AAG CAG AGG
ser cys thr ala ser gly phe asn ile lys asp tyr tyr met his trp val lys gln arg
121/41                              151/51
CCT GAA CAG GGC CTG GAG TCG ATT GGA TCG ATT GAT CCT GAG AAT GGT GAT ACT GAA TAT
pro glu gln gly leu glu trp ile gly trp ile asp pro glu asn gly asp thr glu tyr
181/61                              211/71
GCC CCG AAG TTC CAG GGC AAG GCC ACT ATG ACT GCA GAC ACA TCC TCC AAT ACA GCC TAC
ala pro lys phe gln gly lys ala thr met thr ala asp thr ser ser asn thr ala tyr
241/81                              271/91
CTG CAG CTC AGC AGC CTG GCA TCT GAG GAC ACT GCC GTC TAT TAT TGT AAT TTT TAC GGG
leu gln leu ser ser leu ala ser glu asp thr ala val tyr tyr cys asn phe tyr gly
301/101                             331/111
GAT GCT TTG GAC TAT TCG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT
asp ala leu asp tyr trp gly gln gly thr thr val thr val ser ser gly gly gly gly
361/121                             391/131
TCA GCG GGA GGT GGC TCT GCC GGT GCC GGA TCG GAT GTT TTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC
ser gly gly gly gly ser gly gly gly gly ser asp val leu met thr gln thr pro leu
421/141                             451/151
ACT TTG TCG GTT ACC ATT GGA CAA CCA GCC TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC
thr leu ser val thr ile gly gln pro ala ser ile ser cys lys ser ser gln ser leu
481/161                             511/171
TTG GAT AGT GAT GGA AAG ACA TAT TTG AAT TGG TTG TTA CAG AGC CCA GGC CAG TCT CCA
leu asp ser asp gly lys thr tyr leu asn trp leu leu gln arg pro gly gln ser pro
541/181                             571/191
AAG CGC CTA ATC TAT CTG GTG TCT AAA CTG GAC TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC ACT GGC
lys arg leu ile tyr leu val ser lys leu asp ser gly val pro asp arg phe thr gly
601/201                             631/211
AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTG AAA ATC AAC ACA GTG CAG GCT GAG GAT TTG GCA
ser gly ser gly thr asp phe thr leu lys ile asn arg val glu ala glu asp leu gly
661/221                             691/231
GTT TAT TAT TGC TGG CAA GGT ACA CAT TCT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGC ACC AAG CTG
val tyr tyr cys trp gln gly thr his ser pro leu thr phe gly ala gly thr lys leu
721/241
GAA ATC AAA
glu ile lys

```

ES 2 297 853 T3

SEQ ID nº 2: Secuencias nucleotídica y peptídico de D3M

5

10
 1/1 31/31
 CAG GTC AAG CTG CAG GAG TCA GGG GCA GAA CTT GTG AGG TCA GGG GCC TCA GTC AAT TTG
 gln val lys leu gln glu ser gly ala glu leu val arg ser gly ala ser val asn leu
 61/21 91/31
 15
 TCC TGC ACA GCT TCT GGC TTC AAC ATT AAA GAC TAC TAT ATG CAC TGG GTG AAA CAG AGG
 ser cys thr ala ser gly phe asn ile lys ~~asp tyr tyr met his~~ trp val lys gln arg
 121/41 151/51
 20
 CCT GAA GAG GGC CTG GAG TGG ATT GGA TAT ATT CAT CCT CAG AGT GGT GAA ACT GAA TAT
 pro glu glu gly leu glu trp ile gly tyr ile asp pro glu ser gly glu ~~thr glu tyr~~
 181/61 211/71
 25
 GCC CCG AAC TTC CAG GGC AAG GCC ACT GTG ACT CCA GAC ACA TCC TCC AAC ACA GCC TAC
~~ala pro asn phe gln gly~~ lys ala thr val thr ala asp thr ser ser asn thr ala tyr
 241/81 271/91
 30
 CTG CAC CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC ACA ACC GTC TAT TAC TGT AAT CCA GTC ATC
 leu his leu ser ser leu thr ser glu asp thr thr val tyr tyr cys asn ala ~~val ile~~
 301/101 331/111
 TAC TAT GAA TAC GAC GGC TAT GCT TTG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC AGG GTC ACC GTC
~~tyr tyr glu tyr asp gly tyr ala leu asp tyr~~ trp gly gln gly thr thr val thr val
 361/121 391/131
 35
 TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATT GAG
 ser ser gly gly gly gly ser gly gly gly gly ser gly gly gly gly ser asp ile glu
 421/141 451/151
 40
 CTC ACC CAG TCT CCA TCT TCC CTG GCT GTG TCA GCA GGA GAG AAG GTC GCT ATG AGC TGC
 leu thr gln ser pro ser ser leu ala val ser ala gly glu lys val ala met ser cys
 481/161 511/171
 AAA TCC AGT CAG AGT CTG TTC AAC AGT AGA ACC CGA AAG AAT TAC TTG GCT TGG TAT CAG
~~lys ser ser gln ser leu phe asn ser arg thr arg lys asn tyr leu ala~~ trp tyr gln
 541/181 571/191
 45
 CAG AAA CCA GGC CAG TCT CCT AAA GTG CTG ATC TAC TGG GCA TCC ACT AGG GAA TCT GGA
 gln lys pro gly gln ser pro lys val leu ile tyr ~~trp ala ser thr arg glu ser~~ gly
 601/201 631/211
 50
 GTC CCT GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT
 val pro asp arg phe thr gly ser gly ser gly thr asp phe thr leu thr ile ser ser
 661/221 691/231
 55
 GTG CAG GCT GAA GAC CTG GCA GTT TAT TAC TGC AAG CAA TCT TAT AAT CTA CCG ACG TTC
 val gln ala glu asp leu ala val tyr tyr cys lys ~~gln ser tyr asn leu pro thr~~ phe
 721/241
 GGC GGC GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA
 gly gly gly thr lys leu glu ile lys

60

65