

①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①1 Número de publicación: **2 343 929**

②1 Número de solicitud: 200801167

⑤1 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **23.04.2008**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **12.08.2010**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
12.08.2010

⑦1 Solicitante/s: **Universidad de Granada
Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES**

⑦2 Inventor/es: **Prados Salazar, José Carlos;
Melguizo Alonso, Consolación;
Ortiz Quesada, Raúl;
Rama Ballesteros, Ana Rosa;
Boulaiz, Houria y
Aránega Jiménez, Antonia**

⑦4 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤4 Título: **Gen E para el tratamiento antitumoral.**

⑤7 Resumen:

Gen E para el tratamiento antitumoral. Uso del gen E del bacteriófago Φ X174, de su secuencia de aminoácidos y de composiciones farmacéuticas que lo contengan, que introducido y expresado en las células derivadas de tumores malignos, y especialmente en melanoma, es capaz de inducirles lesiones que las llevan a la muerte celular.

ES 2 343 929 A1

DESCRIPCIÓN

Gen E para el tratamiento antitumoral.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología, biología molecular y medicina. Está relacionada con el desarrollo de nuevos agentes para el tratamiento del cáncer y, en particular, se refiere al uso del gen E del bacteriófago ΦX174, a su secuencia de aminoácidos y a composiciones farmacéuticas que lo contengan, que introducido y expresado en las células derivadas de tumores malignos, y especialmente en melanoma, es capaz de inducirles lesiones que las llevan a la muerte celular.

10 **Estado de la técnica anterior**

La terapia génica consiste en la inserción de genes en las células de los tejidos de un individuo para el tratamiento de enfermedades. La introducción de genes en células tumorales parece una de las más prometedoras vías para el tratamiento del cáncer, demostrando su efectividad en diferentes tipos de tumores, mediante diferentes procedimientos:

1. La introducción de genes supresores de tumores o inhibidores de oncogenes activados en las células tumorales. Por ejemplo, se han desarrollado tratamientos basados en el gen P53 para el sarcoma (Hannay J *et al.* 2007. Isolated limb perfusion: a novel delivery system for wild-type p53 and fiber-modified oncolytic adenoviruses to extremity sarcoma. *Gene Ther.*, 14: 671-81), el cáncer no microcítico de pulmón (Huang CL *et al.* 2007. Clinical significance of the p53 pathway and associated gene therapy in non-small cell lung cancers. *Future Oncol.*, 3: 83-93), y el cáncer de próstata (Ahmad IM *et al.* 2007. 2-Deoxyglucose combined with wild-type p53 overexpression enhances cytotoxicity in human prostate cancer cells via oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 28).

2. El incremento en la inmunogenicidad de los tumores mediante la introducción de citoquinas. Por ejemplo, la transfección de genes de interleukinas para el tratamiento del glioma (Sonabend AM *et al.* 2008. A safety and efficacy study of local delivery of interleukin-12 transgene by PPC polymer in a model of experimental glioma. *Anticancer Drugs.*, 19: 133-142), el tratamiento del carcinoma hepatocelular (Zabala M *et al.* 2007. Induction of immunosuppressive molecules and regulatory T cells counteracts the antitumor effect of interleukin-12-based gene therapy in a transgenic mouse model of liver. *J Hepatol.*, 47: 807-815), o el cáncer de colon y mama (Hanari N *et al.* 2007. Combinatory gene therapy with electrotransfer of midkine promoter HSV-TK and interleukin-21. *Anticancer Res.*, 27:2305-2310; Kudo-Saito C *et al.* 2007. Intratumoral delivery of vector mediated IL-2 in combination with vaccine results in enhanced T cell avidity and anti-tumor activity. *Cancer Immunol Immunother.*, 56: 1897-1910).

3. La introducción de genes que codifican para enzimas que aumentan la sensibilidad de la célula tumoral a agentes quimioterapéuticos. Por ejemplo, el tratamiento mediante la estrategia asesino-suicidas de tipo prodroga/droga basado en el uso de la enzima timidin kinasa o citosin desaminasa (Faneca H *et al.* 2007. Synergistic antitumoral effect of vinblastine and HSV-Tk/GCV gene therapy mediated by albumin-associated cationic liposomes. *J Control Release.* Dec 14; Tang Q *et al.* 2007. Experimental Study of the RV-HSV-TK/GCV Suicide Gene Therapy System in Gastric Cancer. *Cancer Biother Radiopharm.*, 22:755-761; Gopinath P *et al.* 2007. Apoptotic Induction with Bifunctional *E. coli* Cytosine Deaminase-Uracil Phosphoribosyltransferase Mediated Suicide Gene Therapy is Synergized by Curcumin Treatment *In vitro.* *Mol Biotechnol.*, 19; Negroni L *et al.* 2007. Treatment of colon cancer cells using the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide system induces apoptosis, modulation of the proteome, and Hsp90beta phosphorylation. *Mol Cancer Ther.*, 6:2747-2756).

4. La introducción de genes que controlados por promotores tejido específicos inducen la muerte selectiva de la célula tumoral. Por ejemplo, genes de lisis de acción directa (Olijslagers SJ *et al.* Additive cytotoxic effect of apoptin and chemotherapeutic agents paclitaxel and etoposide on human tumour cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007, 100:127-131; Agu CA *et al.* The cytotoxic activity of the bacteriophage lambda-holin protein reduces tumour growth rates in mammary cancer cell xenograft models. *J Gene Med.* 2006; 8:229-241.; Boulaiz *et al.* Transfection of MSR3 melanoma cells with gef gene inhibit proliferation and induce modulation of the cell cycle. *Cancer Science*, 2003, 94: 564-568).

En relación a este último apartado, la utilización de genes de acción directa, cabe destacar los siguientes sistemas:

a) *Sistema de la linamarasa/linamarina* que induce hipoxia y estrés oxidativo utilizando cianuro (Cortes ML *et al.* Cyanide bystander effect of the linamarase/linamarine killer-suicide gene therapy system". *Journal Gene Medicine.* 2002, 4:407-414. Patente. N° 200503173. Patente Internacional PCT/ES2006/000702).

b) *Sistema basado en adenovirus oncolíticos para lesionar* Sistema terapéutico basado en la transfección mediante adenovirus con capacidad de células tumorales (Jiang H, Gomez-Manzano C, Alemany R, Medrano D, Alonso M, Bekele BN, Lin E, Conrad CC, Yung WK, Fueyo J. Comparative effect of oncolytic adenoviruses with E1A-55 kDa or E1B-55 kDa deletions in malignant gliomas. *Neoplasia.* 7:48-56. 2005. Patente: P200600216. (R Alemany and M Cascalló).

c) *Sistema del gen del factor de transcripción E2F-1* para tumores sólidos (Dong Y.B., Yang H.L., Elliott M.J., Liu T.J., Stilwell A., Atienza C., McMasters K.M. Adenovirus mediated E2F-1 gene transfer efficiently induces apoptosis in melanoma cells. *American Cancer Society*, 1999; 86: 2021-2033).

d) *Sistema de la apoptina*, gen viral que induce apoptosis en células tumorales. (Noteborn M. Apoptin acts as a tumor-specific killer: potentials for an anti-tumor therapy. *Cell. Mol. Biol*, 2003).

e) Sistemas de las Perforinas que lesionan las membranas celulares [Narumi K, Kojima A and Crystal RG: Adenovirus vector-mediated perforin expresión driven by a glucocorticoid-inducible promoter inhibits tumor growth *in vivo*. *Am J Respir Cell Biol* 19: 936-941, 1998].

f) Sistema del gen de bacteriófago λ -holin que origina poros en la membrana celular (Agu CA, Klein R, Lengler J, Schilcher F, Gregor W, Peterbauer T, Blasi U, Salmons B, Gunzburg WH and Hohenadl C. 2007. Bacteriophage-encoded toxins: the lambda-holin protein causes caspase-independent non-apoptotic cell death of eukaryotic cells. *Cell Microbiol* 9: 1753-1765).

g) Sistema del gen *gef* que induce diferenciación celular (Boulaiz *et al.* 2003. Transfection of MSR3 melanoma cells with *gef* gene inhibit proliferation and induce modulation of the cell cycle. *Cancer Science*, 94: 564-568).

El empleo de otras proteínas de bacteriófagos para el tratamiento de enfermedades o desordenes proliferativos ya ha sido descrito. Así, en WO/2006/008312 se describe el empleo de proteínas holin de bacteriófagos (y en particular de la proteína S105 del fago λ) para inhibir el crecimiento celular o inducir la muerte celular, lo que es especialmente útil para limitar el crecimiento de células cancerosas o erradicarlas, sirviendo para el tratamiento del cáncer.

La proteína E del bacteriófago Φ X174 posee un total de 91 aminoácidos, con carácter muy hidrofóbico y con una región N-terminal implicada en la inserción en la membrana siendo necesario su oligomerización para su correcta función. De sus cuatro dominios el primero es esencial para la lisis ya que a través de él se ancla a membrana (Lubitz W. *et al.* 1984. Requirement for a functional host cell autolytic system for lysis of *Escherichia coli* by bacteriophage Φ X174. *J. Bacteriol.* 153:385-387). Un cambio conformacional en la Prolina de la posición 21 permite la formación de un puente disulfuro (Schon P. *et al.* 1995. Two-stage model for integration of lysis protein E of bacteriophage ϕ X174 into the cell envelope of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 17:207-212) con el que se inicia la formación de un túnel transmembrana (Witte, A. *et al.* 1997. Proline 21, a residue within the alpha-helical domain of Φ X174 lysis protein E, is required for its function in *E. Coli*. *Molecular Microbiology*. 26, 337-346).

Explicación de la invención

En la presente invención se describe el uso del gen E del bacteriófago Φ X174 (y de la proteína que expresa) para el tratamiento de desórdenes proliferativos principalmente de carácter maligno, entre los que se encuentra el melanoma.

En un primer aspecto de la invención, se describe un polinucleótido de ARN o ADN aislado, de aquí en adelante polinucleótido de la invención, capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica, con una identidad con la SEQ ID N° 1 de al menos un 50%, preferentemente de al menos un 60%, más preferentemente de al menos un 80%, y más preferentemente de al menos un 90%, de al menos un 95% o de un 100%, para su uso en el tratamiento de desórdenes proliferativos.

Otro aspecto de la invención se refiere a una secuencia aminoacídica, de aquí en adelante secuencia aminoacídica de la invención, que comprende un péptido con una identidad con la SEQ ID N° 1 de al menos un 80%, y más preferentemente de al menos un 90%, de al menos un 95% o de un 100%, para su uso en el tratamiento de desórdenes proliferativos.

La SEQ ID NO: 1 recoge la secuencia de aminoácidos de la proteína E aislada del bacteriófago Φ X174. Cuando comparamos la secuencia de la proteína E del bacteriófago Φ X174 con la secuencia de otras proteínas E de lisis aisladas de otras especies de fagos (fago NC13, NC10, Φ K, ID8, α 3, G4, WA2,...) es evidente que existen ciertas regiones en que están más conservadas que otras. Esta información puede ser indicativa de que esas zonas son cruciales para mantener la estructura o función de la proteína. Por tanto, puede esperarse que la identidad global de las proteínas de lisis homologas a la proteína E del bacteriófago Φ X174, a nivel de los aminoácidos, y más concretamente a nivel de la secuencia aminoacídica que se recoge en la SEQ ID NO: 1, sea de un 50% o mayor, y más preferiblemente de un 60% o mayor y más preferiblemente de un 80, o un 90%, un 95% o mayor. La correspondencia entre la secuencia aminoacídica de la(s) proteína(s) E putativa(s) y la secuencia de otras proteínas se puede determinar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, aquéllas se pueden determinar por una comparación directa de la información de secuencia aminoacídica procedente de la proteína E homologa putativa, y la secuencia aminoacídica que se recoge en la SEQ ID NO: 1 de esta memoria.

Péptidos homólogos a la proteína E del bacteriófago Φ X174 (SEQ ID NO: 1) mantendrían su función biológica. Por ejemplo, la actividad de lisis de la célula hospedadora que reside en la porción N-terminal (Blasi and Lubitz 1985. Influence of C-terminal modifications of Φ X174 lysis gene E on its lysis-inducing properties. *J. Gen. Virol.* 66: 1209-1213.), que requiere un sistema enzimático autolítico de dicha célula hospedadora (Holtje y van Duin 1984. MS2-phage induced lysis of *E. coli* depends upon the activity of the bacterial autolysins. Pp. 195-199 in C. Nombela, ed. Microbial cell wall synthesis and autolysis. Elsevier Science; Lubitz *et al.* 1984. Requirement for a functional host cell autolytic enzyme system for lysis of *Escherichia coli* by bacteriophage Φ X 174. *J. Bacterial.* 159:385-387).

ES 2 343 929 A1

Estos péptidos homólogos a la proteína E del bacteriófago Φ X174 podrían ser modificados para potenciar la actividad biológica de dicha enzima. Así, por ejemplo, se podrían sustituir aminoácidos en la SEQ ID NO: 1 para potenciar dicha actividad. Los métodos para producir tales secuencias derivadas afines, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria, o escisión enzimática y/o ligación de ácidos nucleicos, son bien conocidos en la técnica, como lo son los métodos para determinar si el ácido nucleico así modificado tiene una homología significativa con la secuencia que se está considerando, por ejemplo, por hibridación. Estos péptidos serían homólogos a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Por tanto, como “gen E”, en el contexto de la presente invención, se define una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína E, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoácídica de la SEQ ID NO: 1,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoácídica con una identidad de, al menos, un 99%, 98%, 95%, o un 90% con la SEQ ID NO: 1

en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad biológica del gen E del bacteriófago Φ X174.

En otro aspecto de la invención se proporciona una construcción genética de ADN o ARN, en adelante construcción genética de la invención, la cual dirigiría la transcripción *in vitro* o intracelular del polinucleótido de la invención, y que comprende, al menos, uno de los siguientes tipos de secuencias:

a) secuencia de nucleótidos, preferiblemente de doble cadena, que comprende, al menos, la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 1 para su transcripción *in vitro* o *in vivo*, o

b) secuencia de nucleótidos, preferiblemente de doble cadena, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 1, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés, y con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc...para su uso en el tratamiento de desórdenes proliferativos.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición (de aquí en adelante composición de la invención) que comprende el polinucleótido de la invención, la secuencia aminoácídica de la invención, y/o la construcción genética de la invención, o cualquiera de sus combinaciones, para su uso en el tratamiento de desórdenes proliferativos.

En esta memoria se entiende por “desórdenes proliferativos” aquellos tales como por ejemplo, hiperplasia prostática benigna, adenomatosis familiar, poliposis, neurofibromatosis, psoriasis, proliferación de células lisas vasculares asociada con aterosclerosis, fibrosis pulmonar, artritis, glomerulonefritis y estenosis y reestenosis posquirúrgicas, y se entiende por “desórdenes proliferativos malignos”, una variedad de cánceres incluyendo, pero sin limitar: carcinoma tal como de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, esófago, vesícula biliar, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides, próstata y piel, incluyendo carcinoma de células escamosas; tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, linfoma de células pilosas, y linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos de linaje mielode, incluyendo leucemias mielogénicas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica; tumores de origen mesenquimático, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma; tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; otros tumores, incluyendo melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentario, queratoacantoma, cáncer folicular de tiroide y sarcoma de Kaposi.

En esta memoria, se entiende por “melanoma” un tumor maligno de los melanocitos, que se encuentra principalmente en piel, pero también en el sistema gastrointestinal y en el ojo. Es uno de los cánceres de piel raros, pero causa la mayoría de las muertes por cáncer de piel. Se debe principalmente a un crecimiento incontrolado de las células pigmentarias, llamadas melanocitos.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, los desórdenes proliferativos son desórdenes proliferativos malignos. En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, el desorden proliferativo maligno es el melanoma.

5 Las composiciones de la presente invención permiten la transfección del polinucleótido, de la secuencia aminoacídica o de la construcción genética de la invención al interior de una célula, *in vivo* o *in vitro*. La transfección se podría llevar a cabo, pero sin limitarnos a, transfección directa (sistemas químicos como transferencia con fosfato de calcio, o físicos como la microinyección, la electroporación, o la introducción del ADN desnudo) o vectores (no virales, como por ejemplo los liposomas, liposomas catiónicos, o biolística o Gene-gun; o vectores virales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (VAA), o herpesvirus) que faciliten el acceso de la proteína de lisis celular de la invención al interior de la célula. Así, ejemplos de estos vectores son, sin limitarse a, retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del *Herpes simplex*, plásmidos de DNA no virales, liposomas catiónicos y conjugados moleculares.

15 Así, por ejemplo, la secuencia aminoacídica de la presente invención, así como el polinucleótido de la invención, pueden conjugarse con péptidos o proteínas de liberación u otros compuestos para favorecer su transporte al interior de la célula. Entre estas proteínas se encuentran aquellas conocidas en el estado del arte, que tienen propiedades que favorecen la penetración en las células.

20 Una propiedad interesante de los liposomas es su habilidad natural para penetrar en células cancerosas. La pared endotelial de los vasos sanguíneos en humanos sanos está recubierta por células endoteliales que están unidas por la *zonula occludens* o “*tight junctions*”. Estas retienen grandes partículas en la sangre impidiendo su extravasación. Los vasos que nutren células tumorales no contienen el mismo nivel de sellado y son diagnósticamente más permeables. Los liposomas de ciertos tamaños, generalmente menores a 400 nm, pueden entrar rápidamente en áreas tumorales desde la sangre, pero son retenidos en el torrente sanguíneo por las paredes endoteliales de los tejidos vasculares sanos. Esta habilidad se conoce como “*Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect*”. Por ello, resulta especialmente adecuado formular moléculas anticancerígenas en liposomas.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende el polinucleótido de la invención, la secuencia aminoacídica de la invención, la construcción genética de la invención, o cualquiera de sus combinaciones, y además un sistema lipídico.

35 La transfección del polinucleótido, la secuencia aminoacídica o la construcción genética de la invención, se puede realizar, por tanto, mediante un sistema lipídico. Los liposomas que comprenden lípidos catiónicos pueden encontrar también utilización como portadores para terapéutica genética en aplicaciones *in vivo*. Se han utilizado desde hace más de 20 años, como por ejemplo, el liposoma de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOTMA) que transfectaba con éxito un vector que expresa ADNC-luciferasa en cerebro embrionario de *Xenopus in vivo*.

40 La clave del éxito de la transfección por medio de vectores lipídicos radica en que protegen mecánicamente al ADN de la degradación plasmática, ofreciendo a la vez la oportunidad de controlar su biodistribución, independientemente del tamaño del segmento de ADN que se quiera expresar. Asimismo, son no carcinogénicos y pobremente inmunogénicos, y cada vez son más eficientes frente a los vectores virales, sumado a las ventajas de extrema versatilidad, facilidad de preparación y bioseguridad propias de las moléculas autoensamblables. Además, los liposomas pueden formularse ventajosamente en formas de administración tales como geles, pomadas, lociones y similares, de acuerdo con procedimientos conocidos. Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el sistema lipídico es un liposoma.

50 Un “liposoma”, tal y como se entiende en esta memoria, es una vesícula esférica con una membrana compuesta de un fosfolípido y un colesterol bicapa. Los liposomas pueden estar compuestos de fosfolípidos derivados en la naturaleza con cadenas de lípidos mezclados (como la fosfatidiletanolamina presente en el huevo) o de componentes tensoactivos como el DOPE (dioleoylphosphatidylethanolamine). Por definición, los liposomas contienen un núcleo de solución acuosa; los lípidos esféricos que contienen material no acuoso se denominan micelas.

55 Se contempla que las composiciones de la presente invención puedan ser composiciones farmacéuticas, que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de la secuencia polinucleotídica, de la secuencia de aminoácidos y/o de las construcciones genéticas de ARN ó ADN de la invención, o cualquiera de sus combinaciones, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

60 Por tanto, en otro aspecto de la invención se proporciona una composición, de aquí en adelante composición farmacéutica de la invención, que contiene la secuencia de polinucleótidos de la invención, la secuencia de aminoácidos de la invención, la construcción genética de la invención, o cualquiera de sus combinaciones, y un sistema lipídico, para su uso como medicamento. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica de la invención se usa para el tratamiento de desórdenes proliferativos. En una realización más preferida de este aspecto de la invención, los desórdenes proliferativos son malignos, y en una realización particular de este aspecto de la invención, el desorden proliferativo maligno es el melanoma.

65 El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere, por tanto, al uso de composición farmacéutica de la invención como medicamento.

ES 2 343 929 A1

Aunque sin limitarse, dicha composición farmacéutica puede aplicarse a cualquier tejido u órgano canceroso empleando las vías de administración conocidas en el estado de la técnica, por ejemplo por administración intratumoral o intravesical. Los tejidos y órganos cancerosos incluyen cualquier tipo de tejido u órgano que tenga una membrana epitelial, tales como el tracto gastrointestinal, la vejiga, el tracto respiratorio, la vulva, el cérvix, la vagina o los bronquios; los tumores metastásicos locales del peritoneo; el cáncer bronquio-alveolar; el cáncer metastásico pleural; el cáncer de la boca y de las amígdalas; el cáncer nasofaríngeo, de nariz, de laringe, de esófago, de estómago, de colon y de recto, de la vesícula biliar, de la miel; y más particularmente el melanoma.

En el contexto de la presente invención el término “homología”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente, a la semejanza entre los aminoácidos de dos o más proteínas o secuencias aminoacídicas.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias aminoacídicas que se comparan.

Tal y como se usa en esta memoria, el término “transfección” se refiere a la introducción o transferencia de una molécula de ácido nucléico exógena en una célula eucariota, incluyendo, pero no limitándose a ella, una molécula de ácido ribonucleico o desoxirribonucleico (por ejemplo, RNA ó DNA desnudo).

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de polinucleótido, de la secuencia aminoacídica o a la cantidad de una construcción génica de RNA o DNA de la invención, que permitan su expresión intracelular calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichas secuencias y construcciones y el efecto terapéutico a conseguir. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede ser facilitada por cualquier vía de administración, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición proporcionada por esta invención se efectúa por vía intratumoral.

El término “polinucleótido” como aquí se usa se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, bien ribonucleótidos o bien desoxirribonucleótidos. Este término sólo se refiere a la estructura primaria de la molécula. Así, este término incluye ADN de cadena doble o sencilla, al igual que ARN de cadena doble o sencilla. También incluye todos los tipos de modificaciones conocidas (marcadores conocidos en la técnica, metilación, remates, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleótidas como, por ejemplo, aquellas con uniones sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, triésteres de fósforo, amidatos de fósforo, carbamatos, etc.) y con uniones cargadas (por ejemplo, tioatos de fósforo, ditioatos de fósforo, etc.), aquellos que contienen mitades colgantes, como, por ejemplo, proteínas (incluyendo por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con uniones modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), al igual que formas no modificadas del polinucleótido.

Un “vector” es un replicón al que se ha unido otro segmento polinucleótido, para realizar la replicación y/o expresión del segmento unido.

Un “replicón” es cualquier elemento genético que se comporta como una unidad autónoma de replicación polinucleótida dentro de una célula; esto es, capaz de replicarse bajo su propio control.

“Secuencia de control” se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias codificadoras a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariontes, dichas secuencias de control generalmente incluyen un promotor, un sitio de unión ribosomal, y señales de terminación; en eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores, señales de terminación, intensificadores y, en ocasiones, silenciadores. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa.

“Unidos de forma operativa” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a una secuencia codificadora está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Un “marco de lectura libre” (ORF) es una región de una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido; esta región puede representar una porción de una secuencia codificadora o una secuencia codificadora completa.

Una “secuencia codificadora” es una secuencia de polinucleótidos que se transcribe a ARNm y/o se traduce a un polipéptido cuando está bajo control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificadora

se determinan mediante un codón de inicio de traducción en el extremo 5' y un codón de finalización de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificadora puede incluir, pero no se limita a ARNm, ADNc, y secuencias de polinucleótidos recombinantes.

5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

Breve descripción de las figuras

15 Figura 1. Observación mediante microscopía óptica de los cambios morfológicos y densidad celular ocurridos en la línea B16-F10 tras el tratamiento con el gen E (A, Control: B, Tratamiento con gen E a 48 horas, C, Tratamiento con gen E a las 144 h).

20 Figura 2. Estudio de la proliferación de la línea de melanoma B16-F10 sometida al tratamiento continuo mediante la transfección del gen E.

Figura 3. Efecto antitumoral del gen E sobre tumores derivados de la línea de melanoma B16 en ratones Balb/c. Comparación del crecimiento del tumor tratado con gen E con el crecimiento del tumor control.

25 Exposición detallada de modos de realización

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos *in vitro* e *in vivo*, realizados por los inventores.

30 a) Construcción del vector para la transfección del gen E

Para obtener una construcción adecuada que permitiera llevar a cabo el tratamiento *in vivo* e *in vitro* de las células de melanoma B16-F10 y de los tumores desarrollados a partir de ellas en animales de experimentación, se procedió a la amplificación del *gen E* mediante primers específicos. El gen amplificado como resultado de la PCR, que se realizó permitiendo que la Taq polimerasa añadiese colas de Adenina en los extremos del gen, fue integrado gracias a la acción de la topoisomerasa en el vector pCDNA3.1 de expresión en eucariota. La ligación fue introducida en bacterias competentes DH5 alpha que fueron crecidas primero en placas de petri estériles y luego en medio LB para la obtención de grandes cantidades de pCDNA 3.1D-E. El agente terapéutico una vez obtenidos fue secuenciado utilizando el primer universal T7, que se encuentra aguas arriba de los genes en el pcDNA3.1D, para comprobar la orientación correcta del inserto que garantice la colocación correcta del promotor-codón de inicio del gen E (correcta para la transcripción del gen E) y para determinar la posible presencia de mutaciones. La construcción resultante fue transfectada en la línea B16-F10. Se realizaron también transfecciones en A-549 y MCF-7.

45 b) Transfección del gen E en células en cultivo

La transfección se realiza mediante liposomas. Se preparó una mezcla de liposomas-vector de expresión con diferentes proporciones. La preparación fue realizada en medio sin suero bovino fetal. La posterior efectividad de la transfección determinó que la proporción más eficaz fue 3/1 (liposoma/vector) que la fue la que se utilizó en todas las experiencias de transfección. Las células fueron transfectadas con el plásmido sólo (control) y con el plásmido con el *gen E* insertado.

50

c) Efectividad de la transfección del gen E in Vitro

La optimización de la transfección fue realizada mediante el gen de la beta-galactosidasa, que permite una valoración colorimétrica. Se realizó transfección de las mismas células tumorales mediante liposomas y vector conteniendo el gen de la beta-galactosidasa en las mismas proporciones descritas anteriormente. Tras diferentes tiempos de inducción se procedió al revelado mediante x-gal que se transformó por la enzima dando una coloración azulada a la célula transfectada. Con este procedimiento observamos que la eficiencia de la transfección con la proporción vector/liposoma utilizada se situó entre el 50-70% en las líneas B16-F10 de melanoma. En las líneas de cáncer de pulmón y cáncer de mama la tasa de transfección fue similar.

60

d) Efecto de la expresión del gen E en la proliferación in vitro

La expresión del *gen E* en las células de melanoma B16-F10 en cultivo provoca una significativa reducción en la tasa de proliferación celular. La inhibición de la proliferación fue progresiva situándose en un 15% a las 48 de tratamiento, en un 50 y un 55% a las 94 y 120 horas de tratamiento y alcanzando la máxima inhibición a las 144 horas (68%). Resultados similares fueron observados en las líneas de cáncer de mama y de pulmón.

65

ES 2 343 929 A1

e) *Efectividad de la transfección del gen E in vivo*

Tras la generación de melanomas en ratones el vector pCDNA3.1 con el *gen E* fue inoculado en los tumores utilizando un reactivo de naturaleza liposomal incorporando una solución de Glucosa al 10%. Tras una agitación suave que permite la fusión vector estructura liposomal y una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente se procedió a las repetidas inyecciones con de 100 μ l de la mezcla. La determinación de la efectividad de la transfección se realizó mediante el uso del vector conteniendo el gen de la beta-galactosidasa (control) que permitía una valoración colorimétrica del proceso. Dicha efectividad se situó entre el 50 y 70%.

f) *Expresión del gen E en tejido tumoral (melanoma)*

Los tumores inducidos en ratones, tras el tratamiento mediante los vectores de expresión no regulada pCDNA3.1-D que contenían el *gen E*, fueron procesados para obtener el ARN total y demostrar que entre éste se encontraban ARNs mensajeros que codificaban para la proteína E. Mediante la realización de una RT (retrotranscripción) y posteriormente una PCR con primers específicos para la amplificación del *gen E*, se pudo demostrar la presencia y la expresión este gen en todas las muestras de tejido tratadas. La presencia de amplificaciones con bandas de 110 pb indicaban la presencia del *gen E* y por tanto la eficacia de la transfección.

g) *Efecto antitumoral del gen E sobre melanoma in vivo*

Para determinar la modificación en el crecimiento de tumores (melanomas) derivados de la línea B16-F10 e inducidos en ratones se utilizaron dos grupos de animales de experimentación: Grupo 1: tratamiento con pCDNA3.1D-E y Grupo 2 (control) tratamiento con pCDNA3.1D-Lacz. El tratamiento consistió en la administración del agente terapéutico (o el vector control) cada 24 h., en una secuencia continua de 8 días. Las dosis utilizadas fueron de 20 μ gr del vector con el gen terapéutico o vector vacío. Se procedió al sacrificio de animales de experimentación cada 48 h y a la consiguiente extracción del tumor. Cada tumor fue valorado volumétricamente con el objeto de determinar las modificaciones de crecimiento.

La curva patrón del crecimiento del tumor sin tratamiento (control) demostró que los tumores aumentaron de tamaño progresivamente desde los dos días de evolución (volumen medio de 1.91 cm^3) hasta los 2.34 cm^3 a las 144 h de tratamiento. Este patrón de crecimiento ya ha sido descrito en estos tipos de tumores y corresponde una cinética de crecimiento gompertziana, típica de los melanomas.

La determinación del tamaño tumoral en los grupos de ratones sometidos a tratamiento con vectores con y sin el *gen E* determina:

1. Que el crecimiento de los tumores inducidos con B16-F10 y tratados con el *gen E* sufren disminución significativa del tamaño tumoral a lo largo de todo el tratamiento. El seguimiento del crecimiento tumoral demostró que el volumen del tumor se situó en 0.54 y 0.75 cm^3 a las 48 y 96 horas del tratamiento lo que supone un mantenimiento en su volumen inicial y por tanto una importante falta de crecimiento. Este valor se mantuvo a las 144 h de tratamiento en donde el volumen fue de 0.6 cm^3 . Sin embargo el dato más interesante se produjo en la fase final del tratamiento en donde el tumor sólo alcanzó 0.4 cm^3 lo que supone no sólo una disminución en cuanto al volumen inicial sino una reducción significativa en relación al volumen alcanzado por el tumor tratado con el vector vacío (control) (13.07 cm^3).

2. Que el crecimiento de los tumores inducidos en ratones y tratados con el vector vacío (control) y con el gen de la beta-galactosidasa fue similar al de los tumores control sin tratamiento, lo que indica que, efectivamente, el efecto antitumoral es ocasionado por la acción del *gen E*.

h) *Mecanismo de acción del gen E sobre melanoma*

Los estudios realizados mediante microscopía electrónica de transmisión sobre los tejidos tumorales tratados con el *gen E* demuestran una alteración significativa de la estructura de la membrana de las mitocondrias. Dichas organelas aparecen aumentadas de tamaño, desestructuradas, en menor cantidad y con la presencia de roturas a nivel de las crestas. Esto sugiere un posible efecto del *gen E*, dado la estructura de la proteína que codifica y su fijación en membrana, sobre la integridad de dichas membranas.

i) *Comparación de los efectos del gen E sobre melanoma con otros sistemas de genes killer*

Los datos obtenidos en relación al crecimiento de los tumores inducidos con B16-F10 y tratados con el *gen E* indican una reducción de tamaño superior a la encontrada con otros tipos de tratamiento basados en terapia génica con genes "killer" como es el caso del *gen gef*.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polinucleótido de ARN o ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende un péptido con una identidad con la SEQ ID N° 1 seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

- a. al menos un 50%,
- b. al menos un 60%,
- c. al menos un 80%,
- d. al menos un 90%,
- e. al menos un 95%, o
- f. de un 100%

en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de desórdenes proliferativos.

2. Uso de una secuencia aminoacídica que comprende un péptido con una identidad con la SEQ ID N° 1 seleccionada de entre cualquiera de las siguientes:

- a. al menos un 80%,
- b. al menos un 90%,
- c. al menos un 95%, o
- d. de un 99%,

en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de desórdenes proliferativos.

3. Uso de una construcción genética de ADN o ARN que comprende, uno de los siguientes tipos de secuencias:

- a. secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, el polinucleótido según la reivindicación 1 o la secuencia codificante de la SEQ ID NO: 1, para su transcripción *in vitro* o *in vivo*, o
- b. secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende el polinucleótido de la reivindicación 1, operativamente enlazada con, al menos, un promotor que dirija la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos, y/o con otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar,

en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de desórdenes proliferativos.

4. Uso de una composición que comprende el polinucleótido según la reivindicación 1, la secuencia aminoacídica según la reivindicación 2, la construcción genética según la reivindicación 3, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de desórdenes proliferativos.

5. Uso de la composición según la reivindicación anterior, donde el desorden proliferativo es maligno.

6. Uso de la composición según la reivindicación anterior, donde el desorden proliferativo maligno es el melanoma.

7. Composición que comprende:

- a. un polinucleótido según la reivindicación 1, una secuencia aminoacídica según la reivindicación 2, una construcción genética según la reivindicación 3, o cualquiera de sus combinaciones, y
- b. un sistema lipídico.

8. Composición según la reivindicación anterior, donde el sistema lipídico es un liposoma.

9. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en la elaboración de un medicamento.

ES 2 343 929 A1

10. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de desórdenes proliferativos.

5 11. Uso de la composición según la reivindicación 10, donde el desorden proliferativo es maligno.

12. Uso de la composición según la reivindicación 11, donde el desorden proliferativo maligno es el melanoma.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

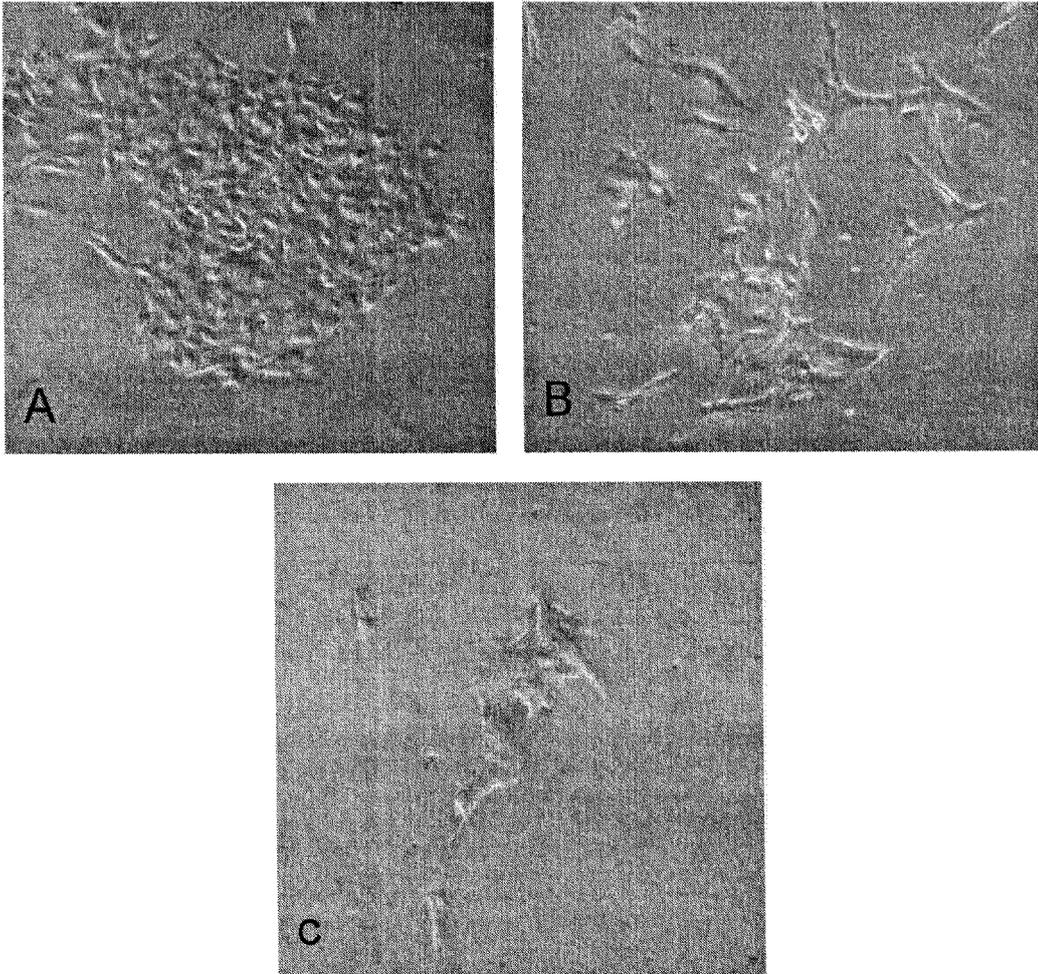


FIG 1

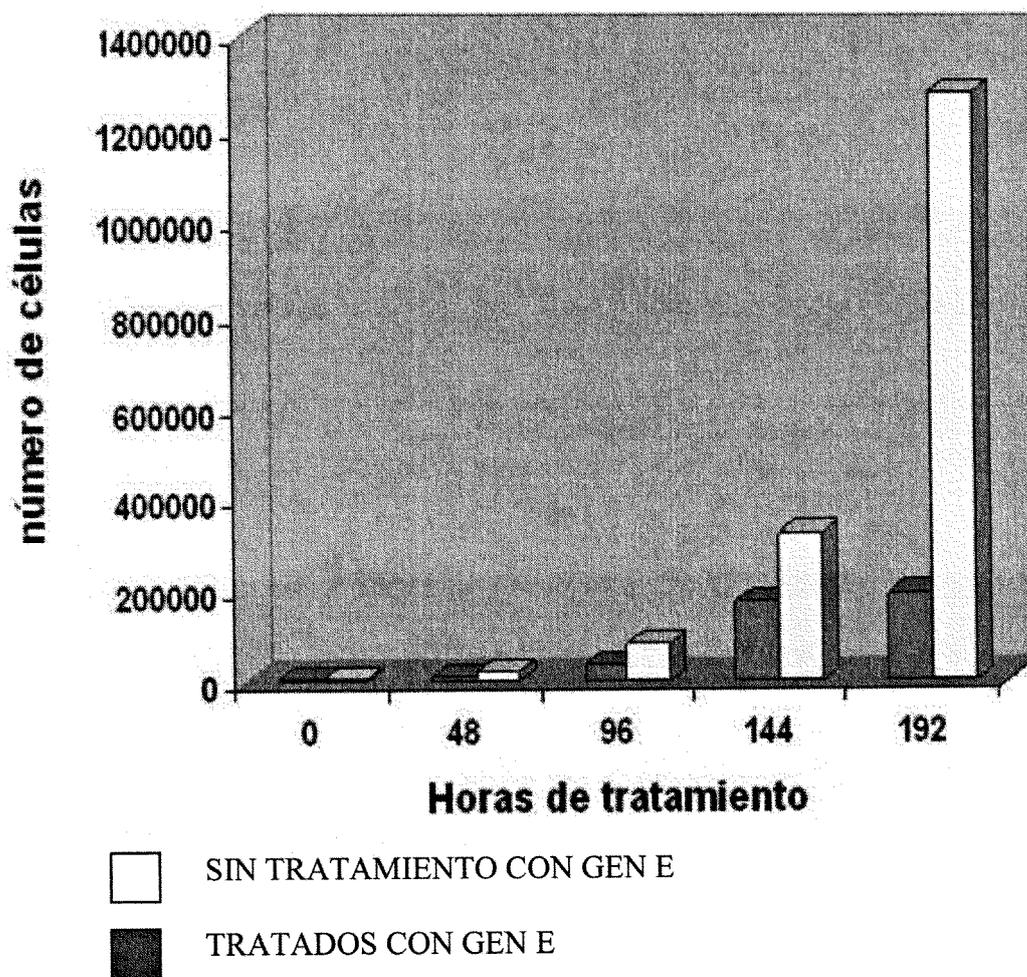


FIG 2

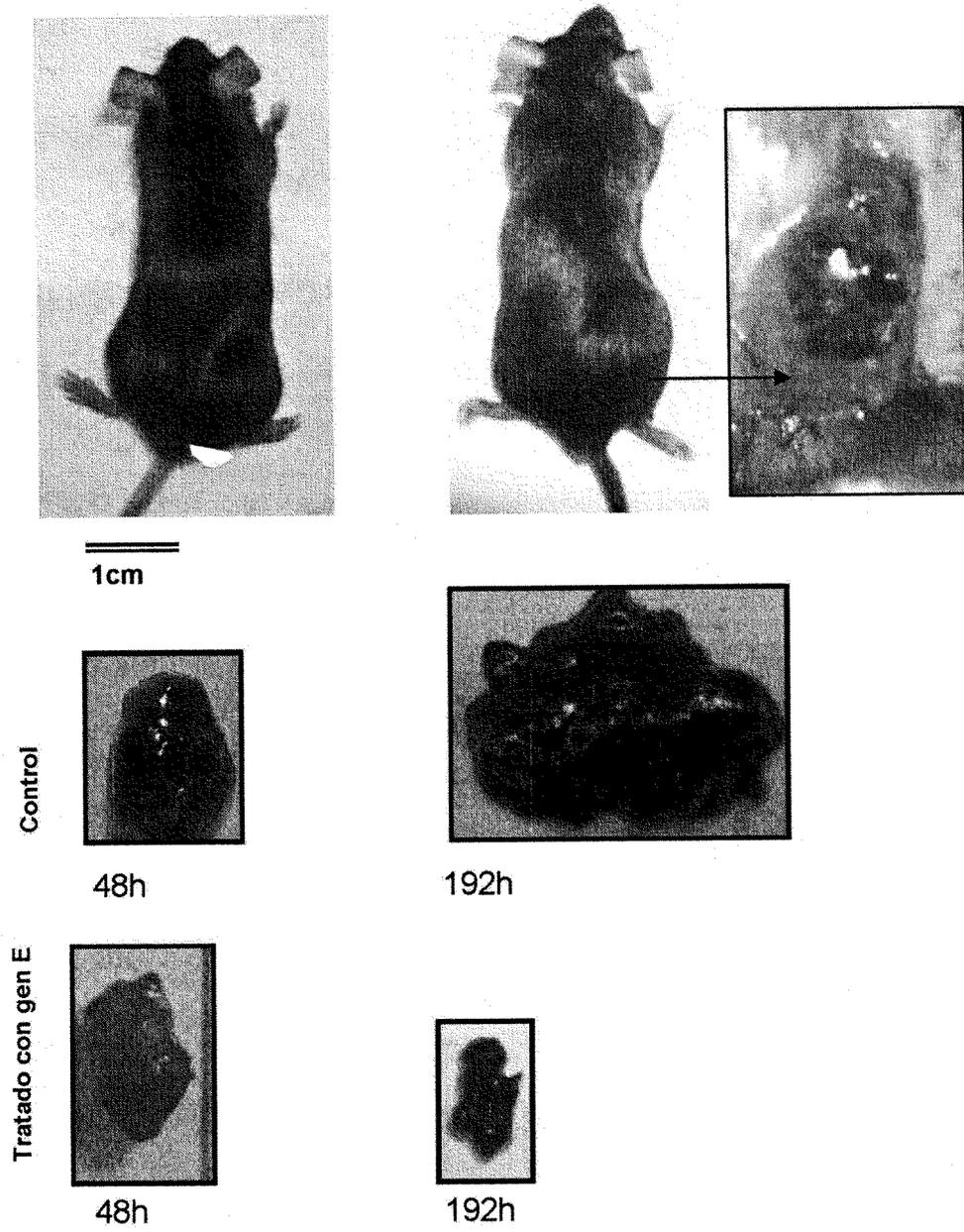


FIG 3

ES 2 343 929 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Granada

5 <120> Gen E para el tratamiento antitumoral

<130> ES1634.11

10 <160> 1

<170> PatentIn versión 3.4

15 <210> 1

<211> 91

<212> PRT

20 <213> Bacteriophage phi-X174

<400> 1

25 Met Val Arg Trp Thr Leu Trp Asp Thr Leu Ala Phe Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Ser Leu Leu Leu Pro Ser Leu Leu Ile Met Phe Ile Pro Ser Thr Phe
20 25 30
30 Lys Arg Pro Val Ser Ser Trp Lys Ala Leu Asn Leu Arg Lys Thr Leu
35 40 45
35 Leu Met Ala Ser Ser Val Arg Leu Lys Pro Leu Asn Cys Ser Arg Leu
50 55 60
40 Pro Cys Val Tyr Ala Gln Glu Thr Leu Thr Phe Leu Leu Thr Gln Lys
65 70 75 80
45 Lys Thr Cys Val Lys Asn Tyr Val Arg Lys Glu
85 90

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 343 929

② Nº de solicitud: 200801167

③ Fecha de presentación de la solicitud: **23.04.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	YOUNG K. y YOUNG R. "Lytic Action of Cloned Phix174 Gene E". Journal of virology, 1982, Vol. 44, páginas 993-1002. Página 993, segunda columna.	1-6
A	SANGER F. et al. "The Nucleotide Sequence of Bacteriophage Phix174". J. Mol. Biol, 1978, 125, páginas 225-246. Figura 4.	1-2
A	BERNHARDT T. G., ROOF W. D. y YOUNG R. "Genetic evidence that the bacteriophage phix174 lysis protein inhibits cell wall synthesis" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 11.04.2000, vol. 97, No. 8, páginas 4297-4302. Páginas 4297 y 4299-4302.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

28.07.2010

Examinador

M. Jesús García Bueno

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBASE, EMBL ALL.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.07.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SÍ
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	YOUNG K. AND YOUNG R. "Lytic Action of Cloned Phix174 Gene E". Journal of virology, 1982, Vol. 44, páginas 993-1002.	1982
D02	SANGER F. et all. "The Nucleotide Sequence of Bacteriophage Phix174". J. Mol. Biol, 1978, 125, páginas 225-246.	1978
D03	BERNHARDT T. G., ROOF W. D. AND YOUNG R. "Genetic evidence that the bacteriophage phix174 lysis protein inhibits cell wall synthesis" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 11.04.2000, vol. 97, No. 8, páginas 4297-4302.	2000

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la presente solicitud consiste en el uso de un polinucleótido de ARN o ADN que codifica para un péptido con una identidad con la SEQ ID NO 1 de, al menos, un 50%; en su secuencia de aminoácidos o una secuencia de aminoácidos con una identidad de, al menos, un 80%; y una construcción genética de ADN o ARN para dirigir la transcripción in vitro o intracelular del polinucleótido de la invención y que comprende el polinucleótido anteriormente citado o una secuencia de nucleótidos que corresponde a un sistema o vector de expresión génica que comprende la secuencia codificante de SEQ ID NO 1, operativamente enlazada con, al menos un promotor, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de desórdenes proliferativos (reivindicaciones 1-3). Por último, el objeto de la presente invención también consiste en el uso de las composiciones farmacéuticas que contengan uno de los objetos de la invención anteriormente comentados o una combinación de ellos para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de desórdenes proliferativos (reivindicaciones 4-6). Estas composiciones farmacéuticas también comprenden un sistema lipídico, preferiblemente un liposoma (reivindicaciones 7-12).

La SEQ ID NO 1 recoge la secuencia de aminoácidos de la proteína E aislada del bacteriófago phix174.

El documento D01 divulga un polinucleótido de ADN aislado capaz de traducirse a una secuencia que comprende la proteína E (SEQ ID N° 1), la secuencia aminoacídica que comprende esta proteína, una construcción genética de ADN o ARN que comprende la secuencia de nucleótidos, correspondiente a un sistema o vector de expresión génica que comprende el polinucleótido capaz de traducirse a una secuencia aminoacídica que comprende la proteína E enlazada con el promotor lac, que produce la lisis en células infectadas por el fago (ver página 993, segunda columna).

El documento D02 divulga el gen E completo, que se traduce en secuencias que corresponden a distintas proteínas, entre ellas, la proteína E (SEQ ID N° 1). También divulga la secuencia aminoacídica que comprende esta proteína, una construcción genética de ADN o ARN que comprende la secuencia de nucleótidos, que comprende el polinucleótido que codifica para el péptido al que corresponde la SEQ ID N° 1 (ver figura 4).

El documento D03 propone un modelo para el mecanismo de lisis de las células mediadas por la proteína E, la cual es sintetizada en el citoplasma y se integra en la parte interna de la membrana. La acumulación de proteína E en la membrana hace que ésta interactúe con Mray, inhibiéndolo, lo cual podría provocar la inhibición de la síntesis de la pared celular y la lisis de la célula. Este documento también divulga la topología de la proteína E teniendo en cuenta que el extremo C-terminal está situado en el citoplasma, aunque no se conoce, sin embargo, si el extremo N-terminal de la proteína E puede atravesar la membrana (ver páginas 4297 y 4299-4302).

Hoja adicional

1. NOVEDAD (Art. 6 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8 Ley 11/1986).

1.1 - REIVINDICACIONES 1-6:

La invención reivindicada difiere principalmente de los documentos D01-D03 en que ninguno de los documentos citados muestra el uso de un polinucleótido de ARN o ADN que codifica para un péptido con una identidad con la SEQ ID NO 1, de una secuencia de aminoácidos que comprende el péptido con una identidad con la SEQ ID NO: 1 de al menos un 80%, o de una construcción genética de ADN o ARN para dirigir la transcripción in vitro o intracelular del polinucleótido de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de desórdenes proliferativos.

No sería obvio para un experto en la materia aplicar las características de los documentos citados y llegar a la invención como se revela en las reivindicaciones 1-6. Por lo tanto, el objeto de estas reivindicaciones 1-6 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.

1.2 - REIVINDICACIONES 7-12:

El documento D01 se considera el más representativo del estado de la técnica al objeto de las reivindicaciones 7-12, y muestra una composición que comprende un polinucleótido de ARN o ADN que codifica para un péptido con una identidad con la SEQ ID NO 1 de, al menos, un 50%; en su secuencia de aminoácidos (ver página 993, segunda columna). El objeto de las reivindicaciones 7-12 de la presente solicitud de invención difiere del documento D01 en que la composición comprende además un sistema lipídico.

Por lo tanto el objeto de las reivindicaciones 7-12 es nuevo e implica actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.