



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 368 963**

⑫ Número de solicitud: 200930417

⑤① Int. Cl.:
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **04.07.2009**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **24.11.2011**

⑫③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
24.11.2011

⑦① Solicitante/s: **Fundación Centro Nacional de
Investigaciones Oncológicas Carlos III
Melchor Fernández Almagro, 3
28029 Madrid, ES**

⑦② Inventor/es: **Soengas González, María Soledad y
Tormo Carulla, Damià**

⑦④ Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

⑤④ Título: **Procedimiento de identificación de agentes terapéuticos contra el melanoma y uso de agente identificado.**

⑤⑦ Resumen:
Procedimiento de identificación de agentes terapéuticos contra el melanoma y uso de agente identificado. La invención se refiere a un procedimiento para la identificación de compuestos candidatos a ser utilizados como agentes terapéuticos para el tratamiento del melanoma entre aquellos que sean capaces de activar la proteína MDA-5 o de aumentar los niveles de la proteína NOXA, y de desencadenar autofagia. Se basa en que la activación del sensor de dsRNA MDA-5 es capaz de desencadenar la destrucción de células de melanoma por activación tanto de autofagia como de apoptosis, de manera autónoma y selectiva de las células tumorales, sin provocar la estabilización del antagonista natural de NOXA, MCL-1. La invención se refiere también al uso de RNAs de doble cadena o análogos del mismo tales como el ácido poliinosinopolicitidílico (pIC), acomplexados con portadores policatiónicos tales como la polietilenimina (PEI), para la fabricación de medicamentos para el tratamiento del melanoma.

ES 2 368 963 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de identificación de agentes terapéuticos contra el melanoma y uso de agente identificado.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere al campo del tratamiento del cáncer y a la identificación de compuestos válidos para ello. Más concretamente, la invención se refiere a un procedimiento para la identificación de compuestos candidatos a ser utilizados en el tratamiento del melanoma, así como al uso de una combinación de compuestos identificada por dicho
10 procedimiento como combinación adecuada para tratar el melanoma.

Antecedentes de la invención

El melanoma representa un prototipo de los cánceres sólidos con una creciente incidencia y un pronóstico extremadamente grave en los estadios avanzados (Jemal *et al.*, 2008). Al mismo tiempo, el melanoma metastásico continúa siendo un paradigma de los tumores quimio e inmunoresistentes, a pesar de los considerables esfuerzos que se han hecho para identificar las causas que determinan su quimio e inmunorresistencia a nivel molecular. Los únicos agentes aprobados por la Agencia de Fármacos y Alimentos de los EE.UU. (FDA: Food and Drugs Administration) para el tratamiento del melanoma metastásico son el agente alquilante dacarbazina (DTIC) y el inmunomodulador IL-2 (Tawbi and Kirkwood, 2007). Sin embargo, rara vez más del 5% de los pacientes se benefician de respuestas completas y duraderas en el caso de los melanomas metastásicos, y las toxicidades secundarias pueden ser graves. En consecuencia, la supervivencia media actual de los pacientes con melanoma metastásico es de 6 a 10 meses y, por ello, el desarrollo de terapias mejoradas es una prioridad en esta enfermedad (Jemal *et al.* 2007).
15

Inicialmente, el análogo sintético de dsRNA viral conocido como pIC (ácido poliinosin-policitidílico), un compuesto que se ha utilizado durante más de cuatro décadas para estimular el sistema inmune de manera dependiente de IFN (Field *et al.* 1967), pareció dar resultados prometedores como candidato a agente terapéutico contra el melanoma. Desgraciadamente, los estudios clínicos con pIC desnudo demostraron poca estabilidad del pIC y poca inducción del IFN, junto con ausencia de efecto antitumoral detectable en melanoma (Robinson *et al.*, 1976). Así, se considera que
20 el pIC desnudo es un pobre agente antimelanoma.

Los análisis histogenéticos de alta eficacia y los estudios sistemáticos funcionales han supuesto avances significativos en nuestra comprensión del inicio y progresión del melanoma, así como en el descubrimiento de los complejos mecanismos asociados con el fracaso de los tratamientos (Fecher *et al.*, 2007; Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Se están identificando defectos consistentes y alteraciones en las cascadas de señalización de BRAF/MAPK, PI3K/AKT, NF- κ B o NOTCH, proporcionando una plataforma excitante para el diseño racional de fármacos (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Los programas de muerte celular en los que están implicadas las mitocondrias, el retículo endoplásmico están siendo también objeto de estudio, aunque demuestran ser invariablemente ineficaces *in vivo* (Hersey and Zhang, 2008). Sin embargo, la terapia dirigida no ha demostrado ser eficaz en los estudios clínicos sobre melanoma (Flaherty, 2006); o bien los fármacos anticancerígenos no interaccionan con sus dianas de manera efectiva, o tienen que ser administrados siguiendo regímenes de dosificación que dan lugar a niveles de toxicidad inaceptables en los compartimentos celulares normales (Tawbi and Kirkwood, 2007). Es importante mencionar que durante el tratamiento pueden incluso activarse mecanismos compensatorios, que seleccionan poblaciones de células con una quimiorresistencia superior a la inicial (Lev *et al.*, 2004; Shatton *et al.*, 2008; Wolter *et al.*, 2007). De hecho, se considera en general que
25 el melanoma presenta una capacidad notoria para eludir la estimulación de la apoptosis por distintas rutas, capacidad que le resulta muy ventajosa para su progresión y la formación de metástasis, así como para desarrollar una notoria capacidad de resistencia a distintas terapias (revisado por Ivanov *et al.*, 2003).
30

A diferencia de la quimioterapia estándar, cuyo objetivo es matar células tumorales principalmente “desde dentro” (es decir, activando programas intrínsecos de muerte celular), la inmunoterapia, tradicionalmente, ha implicado una cascada indirecta de interacciones célula-célula. En el melanoma, la mayor parte de los esfuerzos se han enfocado a incrementar los niveles o la eficacia funcional de dos compartimentos: las células presentadoras de antígenos y las células T citotóxicas (Wilcox and Markovic, 2007). También se están haciendo ensayos con vacunas, así como anticuerpos dirigidos contra inmunomoduladores inhibidores (p. ej. CTL4), aunque con resultados frustrantes en los ensayos clínicos en fase IV (Kirkwood *et al.*, 2008). Más recientemente, se está persiguiendo la estimulación del sistema inmune innato por medio de la activación de los receptores similares a Toll (TLR)-3, -4, -7 y -9, para apoyar la destrucción citotóxica de las células de melanoma mediante citocidas naturales (NK: *natural killers*), células dendríticas (DC: *dendritic cells*) y células T (para revisiones recientes, véanse Kirkwood *et al.*, 2008, o Tormo *et al.* 2007). Sin embargo, múltiples estudios, incluidos estudios de los autores de la invención, han demostrado una capacidad inherente de las células para eludir las terapias inmunológicas regulando a la baja (editando) marcadores inmunorreactivos de superficie. Los melanomas también pueden ejercer efectos supresores sobre el hospedador (p. ej., inhibición de la maduración de las células presentadoras de antígenos o bloqueo de la activación completa de células T) (Tormo *et al.*, 2006; Iikovitch and López, 2008; Verma *et al.*, 2008). Así, puede decirse que los melanomas presentan también una capacidad inherente para eludir la actividad antitumoral de los inmunomoduladores.
35
40
45
50
55
60
65

En el marco de la inmunoterapia, una de las moléculas cuyo aumento de expresión ha sido estudiado como posible factor positivo en la terapia contra el melanoma es MDA-5 (gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma), el producto de uno de los genes inicialmente descritos como asociados a la diferenciación del melanoma (Kang *et al.*,

2002). MDA-5 es una helicasa con un dominio de unión al RNA de doble cadena (dsRNA), sustrato sobre el cual ejerce la actividad helicasa (Yoneyama *et al.*, 2005), lo que le permite actuar como primera línea de defensa frente al dsRNA viral (Akira *et al.*, 2006). Además, MDA-5 contiene un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD), que se requiere para activar vías de señalización que conllevan la activación de NF- κ B y otros factores de transcripción implicados en la regulación de citoquinas (Kawai *et al.*, 2005). Los receptores de la familia de helicasas a la que pertenece MDA-5 comparten las mismas cascadas de señalización entre ellos y con el adaptador IPS-1. Otros miembros de la misma familia de helicasas son RIG-I (*retinoic acid inducible protein 1*, también abreviado como Ddx58) y LGP2 (*también abreviado como Ddx58*).

Se conoce que tanto IFN- β como el dsRNA provocan la inducción de la transcripción del gen Mda-5, por lo que se ha propuesto un papel potencial del aumento de la expresión de Mda-5 en la supresión del crecimiento inducido por IFN. Pero se ha visto (Kang *et al.*, 2002) que la inducción del MDA-5 endógeno mediante IFN- β es primariamente citostática (es decir, induce la parada del ciclo celular). Así, para desencadenar muerte celular tumoral, MDA-5 tuvo que expresarse ectópicamente a niveles elevados (Kovacsóvic *et al.*, 2002). Aún así, esta actividad pro-apoptótica de la expresión ectópica de MDA-5 resultó ineficaz en células tumorales con una ruta RAS/MEK/EK hiperactiva (Lin *et al.*, 2006), como es el caso de los melanomas (Chin *et al.*, 2006).

La solicitud de patente norteamericana US 2007/0259372 propone la identificación de agonistas o antagonistas del IFN- β , IFN- α o el IFN- γ entre los compuestos capaces de incrementar la expresión de MDA-5 y sugiere también que los inductores de la expresión del gen Mda-5 pueden considerarse candidatos a compuestos inductores de la diferenciación terminal de células tumorales, en particular células de melanoma, por exhibir el promotor del gen de Mda-5 una expresión específica de tejido en los melanocitos. También sugiere un posible papel de MDA-5 en la generación de señales apoptóticas a través de su dominio CARD. Sin embargo, hasta el momento, no se conocía cuáles eran las dianas de MDA-5 capaces de desencadenar la apoptosis, y cómo activarlas de manera trazable y selectiva para las células tumorales. La acusada capacidad del melanoma para eludir los mecanismos que provocan la muerte celular programada tampoco hacía suponer que la activación de señales apoptóticas mediadas por MDA-5 pudiera suponer un mecanismo válido para la terapia contra el melanoma, por lo que la activación de MDA-5 no se había considerado como procedimiento para identificar candidatos a agentes terapéuticos contra el melanoma.

La autofagia, por su parte, está emergiendo como una estrategia alternativa para provocar el funcionamiento de la maquinaria endógena de las células cancerígenas relacionada con la muerte celular. Este proceso implica una intrincada cascada de acontecimientos que conduce, en último lugar, al secuestro de componentes citosólicos para la posterior degradación por los lisosomas (Xie and Klionsky, 2007). Dependiendo del mecanismo de englobamiento o de la naturaleza de la carga que les llega a los autolisosomas, se han descrito múltiples mecanismos de autofagia de los cuales la macroautofagia, o degradación de fragmentos grandes de orgánulos celulares y agregados proteicos, está despertando un creciente interés por su potencial para comprometer la viabilidad celular de las células cancerígenas, privándola de orgánulos clave (p. ej., retículo endoplásmico o mitocondrias) (Hoyer-Hansen, 2008). Sin embargo, se desconoce cómo está regulada la autofagia y su potencial terapéutico no es claro y sencillo (Hippert *et al.*, 2006). Por una parte, la macroautofagia (a la que se hará referencia simplemente como "autofagia" de aquí en adelante) ha demostrado un importante potencial para proteger células frente a una amplia variedad de señales agresivas intracelulares y extracelulares, incluidos los fármacos anticancerígenos, y para favorecer el desarrollo de tumores (Mizushima *et al.*, 2008; Kroemer and Levine, 2008). Paradójicamente, la autofagia ha sido asociada también con muerte celular (Kromer *et al.* 2009). Así, por una parte, la autofagia excesiva o persistente puede promover la muerte celular por depleción de orgánulos clave (tales como el retículo endoplásmico o las mitocondrias); por otra, los inductores de la pro-autofagia también pueden redirigir señales de supervivencia, desregular enzimas lisosomales y, en última instancia, activar muerte celular dependiente o independiente de caspasas (Xie and Klionsky, 2007). En consecuencia, no está claro si la autofagia puede exacerbar la quimio e inmunorresistencia del melanoma, en lugar de mejorar la respuesta al tratamiento, por lo que la viabilidad de la autofagia como estrategia terapéutica en el melanoma no es obvia. Además, ninguno de los más de 20 genes de autofagia descritos hasta la fecha en células de mamífero ha sido caracterizado con detalle en el melanoma. Por ello, se desconoce si la autofagia está regulada en el melanoma de una manera diferente a la de las células normales, que proporcione una ventana para la intervención terapéutica.

En esta situación, sigue pendiente la identificación de agentes terapéuticos para el tratamiento del melanoma, alternativos a los ya autorizados y, especialmente, que sean válidos para el tratamiento de pacientes inmunocomprometidos. También sigue siendo necesaria la identificación de posibles dianas terapéuticas útiles para el desarrollo de procedimientos de identificación de candidatos a agentes terapéuticos para el tratamiento del melanoma entre los compuestos capaces de actuar sobre dichas dianas.

La presente invención proporciona solución a ambos problemas.

Descripción de la invención

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que el RNA de doble cadena (dsRNA) viral y los análogos del mismo, tales como el bien conocido ácido poliinosin-policitidílico (al que se alude habitualmente de forma abreviada como pIC), cuando se administran formando complejos con portadores catiónicos, resultan ser potentes inductores de la muerte de células de melanoma, gracias a que son capaces tanto de desencadenar autofagia como de activar la apoptosis selectiva de células tumorales de melanoma vía NOXA, sin requerir p53 o desencadenar mecanismos compensatorios a la inducción de NOXA. El efecto observado es claramente superior al efecto obtenido cuando se

administra pIC desnudo, en ausencia de portador catiónico, lo que está en consonancia con los pobres resultados que se obtuvieron en las fases clínicas en los estudios de comprobación de la capacidad del pIC como agente terapéutico para el tratamiento del melanoma.

5 Tal como se demuestra más adelante en los Ejemplos de la presente memoria, a diferencia de las respuestas clásica a RNA viral mediadas por células T citotóxicas o asesinas naturales, el pIC (ácido poliinosin-policitidílico) acompañado con PEI (polietilénimina) fue suficiente para promover el suicidio de las células de melanoma y el bloqueo de metástasis mediada por melanomas *in vivo*, incluso en ratones inmunocomprometidos. Los análisis genéticos, funcionales y ultraestructurales descritos más adelante en la presente solicitud demuestran que la inducción de la autofagia por pIC
10 no se desencadena para la protección celular, sino para una destrucción selectiva de células tumorales. Los análisis sobre los mecanismos de muerte dirigidos por pIC mostraron una dependencia estricta de portadores catiónicos para poder llegar al citosol y ejercer su acción.

15 Aunque el pIC estaba considerado como un inductor de la inmunidad controlada por el IFN, el efecto observado es independiente de la activación de la vía de producción y secreción de IFN- α . En consonancia con esa observación, la activación de la vía autofágica hallada se produce incluso en animales inmunocomprometidos.

La administración a células de melanoma del complejo [pIC]^{PEI} es capaz de promover toda una cascada de señalización que conlleva la activación de la expresión y/o la actividad de distintas proteínas, que resulta en una activación tanto de la autofagia como de la apoptosis y que da lugar a la muerte de las células de melanoma, sin afectar a la viabilidad de los melanocitos sanos, es decir, de forma específica de las células tumorales. Esta cascada de señalización proporciona nuevos puntos de actuación para la explotación clínica de programas intrínsecos de reconocimiento de patógenos, autofagia y muerte de células tumorales.

25 Entre las moléculas implicadas en la activación de la autofagia y la apoptosis, los estudios con RNAs de interferencia revelaron que la helicasa MDA-5, cuya expresión y actividad enzimática se activan mediante dsRNA, es un operador clave en la citotoxicidad del pIC acompañado. En presencia del complejo [pIC]^{PEI}, se produce la activación de esta proteína, que se manifiesta por una separación de los dominios helicasa y caspasa como resultado de una ruptura proteolítica. Esta activación es mucho menor (y, en algunas líneas celulares de melanoma, nula), cuando se
30 administra pIC desnudo, sin PEI.

MDA-5 parece actuar como un enlace entre la vía autofágica y la vía apoptótica, cuya activación se puede explotar clínicamente para la terapia del melanoma. Por una parte, contrariamente a las estrategias que se habían seguido previamente, en las que se intentaba provocar un aumento de la expresión de MDA-5 para conseguir la muerte de células tumorales, los resultados que se muestran más adelante en la presente solicitud demuestran que los niveles endógenos de MDA-5 en células de melanoma son suficientes para desencadenar muerte celular, siempre y cuando se aporte al citosol suficiente dsRNA (o un análogo del mismo) de forma apropiada. MDA-5 parece estar implicado en la inducción de programas apoptóticos intrínsecos vía NOXA, provocando un aumento de los niveles de dicha proteína; esta inducción de la apoptosis vía NOXA es independiente del estatus de p53 y no presenta efectos compensatorios sobre MCL-1, un antagonista natural de NOXA que se estabiliza al activar esta última proteína con inhibidores de proteasomas. Esta activación de NOXA, sin activación de MCL-1, representa un punto de acción de MDA-5 sobre la maquinaria apoptótica desconocido hasta ahora, diferente de las vías apoptóticas activadas por inductores de la apoptosis tales como bortezomib, molécula que no tiene ningún efecto en los niveles de MDA-5 o en su procesamiento.

45 Además, los Ejemplos mostrados más adelante en la presente memoria descriptiva muestran que el complejo del análogo del dsRNA pIC con el portador policationico PEI activa la autofagia y desencadena la maquinaria apoptótica en los tumores siguiendo una estrategia inesperada: el tratamiento con este complejo no conduce simplemente a la fusión de autofagosomas individuales con lisosomas discretos, sino que induce marcados cambios estructurales en el compartimento endocítico de las células tratadas, observándose una secuencia ordenada de eventos de fusión que implican el reclutamiento progresivo de marcadores de endosomas, autofagosomas y lisosomas (Rab7, LC3 y Lysotracker, respectivamente). Esta serie Rab7>LC3>Lysotracker sucede en múltiples ciclos sostenidos, hasta que las células tumorales finalmente colapsan, habiéndose observado un intervalo de tiempo considerable desde que se detectan las primeras fusiones endocíticas Rab7/LC3 (dentro de la primera hoja de tratamiento) hasta que sucede el colapso celular final (24-48 h). Además, para que el proceso de la muerte de las células de melanoma se produzca de forma eficiente, es necesaria la actividad de las caspasas, por lo que la activación del factor proapoptótico NOXA provocada por MDA-5 resulta ser una segunda fuerza paralela necesaria para que el efecto citotóxico sea efectivo. Así la helicasa MDA-5, un sensor innato del dsRNA, se revela como un sensor clave de la citotoxicidad específica de células tumorales observada en los tratamientos con el complejo [pIC]^{PEI}, al haber demostrado tener capacidad para
60 activar tanto la autofagia como los programas apoptóticos dependientes de NOXA.

Todo esto tiene como resultado que los activadores de MDA-5, incluido el complejo [pIC]^{PEI}, suministrados de forma adecuada para favorecer su llegada al citosol y el desencadenamiento de la vía autofágica, parecen ser útiles para el tratamiento del melanoma, un tipo de cáncer para el cual, como se ha comentado previamente, apenas hay tratamientos. La destrucción de las células de melanoma así desencadenada no parece afectar a las células sanas. Debido al mecanismo de activación, independiente de IFN y del estatus de p53, el efecto anticancerígeno debería observarse igualmente en individuos inmunocomprometidos.

Así, MDA-5 se presenta como una diana terapéutica adecuada para la búsqueda de agentes para el tratamiento del melanoma entre los activadores de dicha proteína, pues dichos activadores son útiles para desencadenar la autodestrucción de células tumorales mediante una activación coordinada de lisosomas intrínsecos y proteasas apoptóticas, lo cual supone una nueva estrategia para superar la quimiorresistencia y la inmunorresistencia del melanoma. Esta estrategia presenta ventajas sobre los agentes terapéuticos estándar porque activa tanto la autofagia como la apoptosis en células tumorales, de manera autónoma y selectiva.

Dada la similitud estructura de MDA-5 con las otras helicasas de su misma familia y teniendo en cuenta el hecho de que los receptores de esa familia comparten cascadas de señalización similares entre ellos, es de esperar que otros miembros de la misma familia, tales como RIG-I y LGP2, presenten un comportamiento similar y puedan ser utilizados también como dianas terapéuticas.

Igualmente, la combinación que ha posibilitado el descubrimiento de esta vía por ser capaz de activarla, el complejo [pIC]^{PEI}, o cualquier otra combinación de un análogo de dsRNA y un portador catiónico, se presenta como un buen candidato para ser utilizado para la fabricación de medicamentos para el tratamiento del melanoma.

Por todo ello, un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la identificación de compuestos candidatos a ser utilizados como agentes terapéuticos para el tratamiento del melanoma que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto el compuesto candidato con un cultivo de células de melanoma o de una línea celular derivada de células de melanoma;
- b) determinar al menos uno de los siguientes parámetros:
 - a. el nivel de activación de MDA-5;
 - b. el nivel de expresión de NOXA;
 o combinaciones de los anteriores;
- c) comparar los datos obtenidos con los observados en un control de las mismas células tratadas de igual manera, aunque en ausencia del compuesto candidato;
- d) considerar compuestos candidatos a ser utilizados como agentes terapéuticos para el tratamiento del melanoma aquellos que hayan dado lugar a un aumento significativo respecto al control en el parámetro o parámetros determinados en la etapa b).

La diferencia entre los datos obtenidos del cultivo celular tratado con el compuesto candidato y el cultivo control sin tratamiento se considerará significativa cuando el análisis estadístico dé como resultado valores de $p < 0,05$.

En una posible realización del procedimiento de la invención, el parámetro cuya modificación se determina es el nivel de activación de MDA-5. Este parámetro puede determinarse comprobando la existencia de la ruptura proteolítica de dicha proteína que da lugar a la separación de los dominios helicasa y caspasa: el compuesto candidato a agente terapéutico para el tratamiento del melanoma, como se ha comentado previamente, debería dar lugar a dicha ruptura proteolítica, lo cual es una indicación de que es capaz de dar lugar a la activación de los mecanismos de autofagia y apoptosis previamente mencionados que darían lugar a la muerte de las células de melanoma. Una posible metodología para realizar esta comprobación son las transferencias tipo Western de extractos proteicos de los cultivos celulares y la comprobación de la señal de las bandas correspondientes a la proteína completa y a los fragmentos correspondientes a los dominios helicasa y caspasa. Concretamente, como se muestra en el Ejemplo 3, la aparición de una banda de 30 kD es indicativo de la existencia de ruptura proteolítica.

Alternativamente, podría determinarse también la activación de otras helicasas de la familia de MDA-5, tales como RIG-I o LGP2.

Otra posible realización del procedimiento de la invención es la determinación del nivel de expresión de NOXA, pues, como se ha comprobado previamente, se observa un aumento de los niveles de expresión de los genes correspondientes cuando se produce la activación de los mecanismos de autofagia y apoptosis que se desea que desencadene el compuesto candidato a agente terapéutico. La determinación de los niveles de expresión de cualquiera de estas proteínas puede realizarse, por ejemplo, determinando la concentración del RNA mensajero correspondiente (lo cual puede llevarse a cabo, por ejemplo, por transferencia tipo Northern o por RT-PCR) o la concentración de la propia proteína en un extracto proteico del correspondiente cultivo celular (por ejemplo, mediante una transferencia tipo Western). Se prefiere particularmente que, si se determina el nivel de expresión de NOXA, se determine también la existencia de activación de MDA-5, como corroboración de que se están activando los mecanismos de autofagia y apoptosis deseados, por considerarse MDA-5 un punto de enlace entre ambos.

Se prefiere particularmente que el procedimiento de la invención incluya adicionalmente una etapa de determinación de la inducción de autofagia por parte del compuesto candidato a agente terapéutico contra el melanoma. La inducción de la autofagia puede comprobarse por distintas técnicas, entre las que destaca la determinación del nivel

de expresión y la localización intracelular de proteínas de autofagia (tales como la que se utiliza en los Ejemplos de la presente memoria, LC3) o la determinación por microscopía de la presencia de estructuras características del proceso de autofagia. Entre estas técnicas, son casos específicos:

5 - El seguimiento de las modificaciones postraduccionales de la proteína expresada por el gen de autofagia 8 (al que se alude de forma abreviada como ATG8 o, LC3) la proteína LC3: LC3 se procesa y lipida cuando se inserta en autofagosomas, las estructuras membranosas en las que se secuestran componentes celulares durante la autofagia. La lipidación cambia la conformación y la movilidad electroforética de esta proteína, por lo que una de las posibles técnicas de comprobar la inducción de autofagia es recurrir a técnicas de inmunoblot con anticuerpos dirigidos contra esta
10 proteína, lo que permite comprobar bien que la localización de la banda correspondiente a la proteína tras someterla a electroforesis es diferente en las muestras control con respecto a las muestras en las que se supone que el compuesto candidato ha inducido autofagia o bien, si el anticuerpo reconoce específicamente la forma propia de los autofagosomas, la unión del anticuerpo confirmaría la inducción de autofagia en la muestra tratada con el compuesto candidato.

15 - El seguimiento de los cambios en la distribución intracelular de la proteína LC3, pues otro rasgo distintivo de la autofagia es la relocalización de LC3, desde el citosol a autofagosomas de reciente formación (Xie and Klionsky, 2007). Así, pues la formación de focos de concentración de dicha proteína puede considerarse un indicativo de la formación de autofagosomas, especialmente en fases tempranas, por lo que la determinación de la localización celular de una proteína de fusión de LC3 con, por ejemplo una proteína fluorescente, son ampliamente utilizados como una
20 indicación de estadios tempranos de autofagia. Es habitual el uso como proteína fluorescente de GFP (*green fluorescent protein*: proteína verde fluorescente) o RFP (*red fluorescent protein*: proteína roja fluorescente), que permiten realizar el seguimiento de la autofagia mediante microscopía de fluorescencia: los cambios en la distribución celular de la fluorescencia, de un patrón difuso a una tinción focal son indicativos de la inducción de autofagia. En el caso del procedimiento de la presente invención, la utilización de esta metodología implicaría el uso de células que o bien
25 hubieran sido transfectadas con un vector que permitiera la expresión transitoria de la proteína de fusión, tal como un plásmido o un virus recombinante no integrativo, o con células que en las que el fragmento de DNA capaz de expresión la proteína de fusión formada por la proteína de fusión y LC3 estuviera integrado en el genoma y en las que la expresión de la proteína de fusión pudiera producirse de forma estable. Un ejemplo de tal estrategia se muestra en el Ejemplo 1 de la presente memoria, donde las células fueron transfectadas previamente con un retrovirus recombinante
30 que dio lugar a la inserción en el genoma celular del fragmento de DNA que contenía las partes codificantes de las proteínas GFP y LC3 unidas de tal manera que dieran lugar a una proteína de fusión, llevándose a cabo posteriormente los ensayos de cambios en la distribución intracelular de la fluorescencia con las células transfectadas de forma estable.

- Utilización de microscopía electrónica de transmisión para detectar los autofagosomas ya formados en fases más
35 avanzadas del posible proceso de autofagia, como pueden ser transcurridas 5 horas desde la adición del compuesto a ensayar. La acumulación de estructuras densas frente a los electrones, unidas a la membrana, se considerará un rasgo indicativo de formación de autofagosomas. El transcurso del proceso de autofagia puede confirmarse en fases más tardías del proceso (por ejemplo, a las 24 ó 30 horas del tratamiento con el compuesto a ensayar), momento en el cual la microscopía electrónica debería mostrar la formación de grandes vacuolas fagocíticas, indicativas de colapso celular.
40

Como se ha comentado, el reclutamiento de endosomas es unos de los eventos tempranos del proceso citotóxico en el que se basa la presente invención. Por ello, otra alternativa para complementar el procedimiento de la invención es la detección de la distribución citoplasmática de proteínas de la familia Rab. Concretamente, se prefiere detectar la presencia de endosomas de Rab5 o, más preferiblemente, Rab7.
45

En cuanto a las líneas celulares válidas, puede utilizarse cualquier línea celular procedente de melanoma, preferiblemente procedente de un ser humano. Ejemplos de líneas celulares válidas, que se utilizan en los ejemplos de la invención, son las líneas de células humanas SK-Mel-19, SK-Mel-28, SK-Mel-103 y SK-Mel-147, así como las células de ratón B16.
50

Los ensayos que se describen más adelante en los ejemplos de la presente memoria son muestra de una realización del procedimiento de la invención en la que se llevó a cabo una combinación de determinación de la activación de MDA-5, análisis de expresión de genes (observándose incremento en la expresión de NOXA) y confirmación de la activación de la autofagia por las tres posibles metodologías mencionadas (seguimiento de las modificaciones postraduccionales de la proteína LC3 mediante *immunoblot*;; seguimiento de los cambios en la distribución celular
55 de LC3 mediante la detección de la fluorescencia debida a la proteína fluorescente GFP, con la que LC3 formaba una proteína de fusión GFP-LC3 que se expresaba en células previamente transfectadas con un retrovirus recombinante que contenía una construcción capaz de expresar dicha proteína de fusión; confirmación de la formación de autofagosomas por microscopía electrónica de transmisión a las 5 horas del tratamiento con el compuesto candidato y confirmación de formación de vacuolas fagocíticas a las 30 horas del tratamiento).
60

La aplicación de dicha realización del procedimiento de la invención permitió observar que, inesperadamente, uno de los compuestos que dio lugar a resultados positivos fue un compuesto hasta ahora considerado como un pobre agente terapéutico para el tratamiento del melanoma, el análogo del dsRNA viral abreviado como pIC (ácido poliinosinopolicitidílico). A diferencia de los ensayos previos, en este caso el pIC se puso en contacto con las células formando
65 un complejo con un portador catiónico polimérico, la polietilenimina (PEI); de esta manera, el complejo [pIC]^{PEI}, como se ha comentado previamente, es capaz de activar, en las células de melanoma, tanto la vía autofágica como la vía apoptótica, provocando la muerte de las células de melanoma de forma selectiva, sin afectar a los melanocitos normales

presentes en el mismo cultivo, sin requerir que las células expresen p53 ni que se activen en las células de melanoma vías relacionadas con la inmunidad controlada por IFN, que eran las vías que tradicionalmente se habían considerado activadas por el dsRNA viral y sus análogos. Consecuentemente con esta observación, la activación de la vía autofágica hallada se produce incluso en animales inmunocomprometidos. Así, los resultados obtenidos indican que la inhibición del crecimiento del melanoma por [pIC]^{PEI} se puede favorecer no sólo en presencia de un sistema inmune activo, sino que también es altamente eficaz en animales sin linfocitos T, B o “asesinas naturales” (NK: “*natural killers*”). Estos resultados, los primeros en informar de la muerte de células cancerosas provocada por autofagia desencadenada por análogos de dsRNA viral, proporcionan la prueba del principio de un nuevo tratamiento que explota programas innatos acoplados al dsRNA, pero sin una dependencia estricta de efectores inmunes de la destrucción de células tumorales.

Por todo ello, un segundo aspecto de la presente invención lo constituye el uso de un fragmento de RNA de doble cadena (dsRNA) o un análogo del mismo, en combinación con un portador policatiónico, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del melanoma.

En una realización particularmente preferida del uso de la invención, el medicamento va destinado al tratamiento de un paciente inmunocomprometido.

En una realización de la invención, el fragmento de RNA de doble cadena o análogo del mismo es un fragmento largo. En una realización preferida de la invención, el análogo de RNA largo de doble cadena es el ácido poliinosin-policitídico (pIC). En otra realización preferida, el portador policatiónico es la polietilenimina (PEI). En una realización particularmente preferida de la invención, el análogo de RNA largo de doble cadena es el ácido poliinosin-policitídico y el portador policatiónico es la polietilenimina.

Tal como se utiliza en la invención, el término “fragmento largo de RNA de doble cadena” se utiliza como contraposición a los fragmentos de RNA conocidos como RNAs cortos. Por tanto, se considerará que un RNA de doble cadena (bicatenario) es “largo” si el fragmento de RNA bicatenario comprende al menos 25 nucleótidos por cadena. Se prefiere que el fragmento utilizado sea análogo en longitud a los RNAs intermediarios de doble cadena que aparecen en las células durante el ciclo celular de las mayor parte de los virus RNA y que parecen ser el sustrato natural de las helicasas de la familia de MDA-5, por lo que el RNA de doble cadena de la invención se considerará “largo” especialmente si comprende al menos 100 nucleótidos por cadena y, más especialmente, si comprende al menos 1000 nucleótidos por cadena.

Fragmentos de RNA de doble cadena que se presentan en la naturaleza y que podrían ser útiles para el uso de la invención podrían ser los RNA intermediarios de doble cadena que aparecen durante el ciclo celular de Paramyxovirus (tales como el virus de la enfermedad de Newcastle, NDV; el virus Sendai (SDV)), Rhabdovirus (virus de la estomatitis vesicular (VSV)); flavovirus (virus de la hepatitis C (HCV)), ortomyxovirus (virus Influenza) y picornavirus (virus de la encéfalo-miocarditis (EMCV)).

En cuanto a los análogos de RNA de doble cadena, además del ácido poliinosin-policitídico (pIC), pueden ser útiles para el uso de la invención los RNAs cortos de interferencia (siRNA) o los RNAs que tienen trifosfatos libres en 5' (en contraposición al RNA que se encuentra normalmente en los mamíferos, que tiene cubierto el extremo 5' o tiene modificaciones en la base correspondiente para poder discriminar entre el RNA propio y el ajeno). Entre los análogos no presentes en la naturaleza pueden citarse también: a) aquellos cuyo esqueleto está formado por un compuesto análogo a la ribosa, tales como los basados en LNA (*locked nucleic acid*: ácido nucleico “bloqueado”, por su resistencia a la hidrólisis), morfolino y PNA (*peptide nucleic acid*: ácido nucleico peptídico); b) aquéllos en los que al menos una de las bases nitrogenadas típicas de los nucleótidos del RNA han sido sustituidas por análogos, que pueden dar lugar incluso a apareamientos distintos de los naturales, tales como diaminopurina (que se aparea con el uracilo mediante tres puentes de hidrógeno), el par xantina/diaminopirimidina (donde la forma ceto/ceto de la purina, la xantina, forma tres puentes de hidrógeno con la amina/amina pirimidina), o el par isoguanina/isocitosina (donde al forma amina/ceto de la purina, la isoguanina, forma tres puentes de hidrógeno con la pirimidin-ceto-amina, la isocitosina).

En cuanto al portador policatiónico, son adecuados para los propósitos del uso de la invención todos aquéllos capaces de alterar la permeabilidad de la membrana plasmática y/o inducir endocitosis, favoreciendo la entrada en la célula del RNA de doble cadena o de su análogo y, con ello, favoreciendo la activación de los sensores citosólicos de RNA de dobles cadena, tales como la helicasa MDA-5. Además de la polietilenimina (PEI) y lipofectamina, quedan englobados dentro de esta definición poli-L-lisina, polisilazano, polidihidroimidazolenium, polialilaminem y polietilenimina etoxilada (ePEI).

La invención se ilustra ahora con más detalle mediante los Ejemplos y Figuras que aparecen a continuación.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1. *La inducción de macroautofagia mediante [pIC]^{PEI} da como resultado la muerte celular del melanoma.*

- El panel A muestra imágenes de epifluorescencia de la tinción de focos de eGFP-LC3 similares a los autofagosomas en células de melanoma SK-Mel-103 tratadas durante 12 h con 1 mg/ml de PEI-acomplejado con pIC ([pIC]^{PEI}) (fotografía derecha) o de células tratadas con PEI como agente único (fotografía izquierda, marcada como “Control”).

- El panel B muestra un gráfico en el que se representa la acumulación, en función del tiempo, de células SK-Mel-103 que muestran emisión de fluorescencia puntuada de eGFP-LC3, en tres condiciones, según se indica sobre la curva correspondiente: tras el tratamiento con [pIC]^{PEI}, con el placebo (control), o con rapamicina (ésta última se utilizó como inductor clásico de autofagia).

- El panel C muestra fotografías tomadas de inmunotransferencias de extractos celulares totales aislados de células SK-Mel-103, obtenidas recogiendo las células en los tiempos postratamiento indicados, en horas, sobre cada grupo de tratamientos. Los tratamientos se indican sobre cada carril: control (ningún tratamiento: poblaciones de células control incubadas sólo en presencia del tampón disolvente), pIC o complejo [pIC]^{PEI}. A la izquierda de las fotografías se indican las proteínas analizadas: ATG5 sin modificar (LC3 I), ATG5 tras lipidación (LC3 II) o el control de carga (β -actina); a la derecha se indica el peso molecular, en kDa, de las proteínas teñidas según la altura de aparición de las bandas.

- El panel D muestra microfotografías de microscopía electrónica de células SK-Mel-103 tratadas con [pIC]^{PEI} (columna derecha) o control con PEI (columna izquierda). Las flechas apuntan a los autofagosomas y autolisosomas unidos a la membrana.

- El panel E muestra microfotografías a bajo (fotografías superiores) y bajo (fotografías inferiores) número de aumentos de células SK-Mel-103 5 horas después de la incubación con tampón control (columna izquierda de fotografías) o [pIC]^{PEI} (columna derecha).

- El panel F muestra microfotografías representativas de microscopía de campo claro (paneles izquierdo e intermedio) y de microscopía electrónica (panel derecho) de las poblaciones celulares tratadas según se indica sobre las fotografías, 30 horas después del tratamiento.

Fig. 2: *Microscopía en intervalos de tiempo de la inducción de la autofagia en células de melanoma mediante [pIC]^{PEI}.*

Se muestran microfotografías de fluorescencia tomada a los tiempos indicados después del tratamiento con PEI (control) o [pIC]^{PEI} de células SK-Mel-103 que expresaban eGFP-LC3. Los agregados focales son indicativos de la formación de autofagosomas. Las flechas apuntan a las células que colapsan y se sueltan (mueren) durante el tratamiento.

Fig. 3: *La llegada al citosol de pIC gracias a la presencia de PEI desencadena de forma selectiva la muerte de las células de melanoma.*

- El panel A muestra gráficos que representan el porcentaje de muerte celular, estimada mediante exclusión de azul de tripano 24 y 48 h después de los tratamientos indicados en las leyendas (NT (barras sin relleno): ningún tratamiento; PEI (barras con relleno gris oscuro, ■): polietilenimina; pIC (barras con relleno gris claro, ▨): ácido poliinosin-policitidílico; [pIC]^{PEI} (barras con relleno negro, ■): ácido poliinosin-policitidílico acompañado con polietilenimina), representado como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes realizados con células del tipo que se indica sobre los gráficos. Se observa que sólo las poblaciones de células de melanoma tratadas con [pIC]^{PEI} mueren eficientemente.

- El panel B muestra imágenes de microscopía electrónica de células de melanoma SK-Mel-28 y SK-Mel-103 tratadas con el tampón control (Ctr), PEI, pIC o [pIC]^{PEI}, visualizadas 12 h después del tratamiento. Para cada una de las líneas celulares se muestran fotografías tomadas a dos aumentos. Las flechas apuntan a los autolisosomas, que se observan sólo en las células tratadas con [pIC]^{PEI}.

Fig. 4: *Selectividad por las células tumorales de la actividad citotóxica de [pIC]^{PEI}.*

- El panel A muestra imágenes representativas de campo claro de melanocitos de prepucio humano (fila superior), células de melanoma humano SK-Mel-103 (fila intermedia) y melanoma murino B16 (fila inferior) después del tratamiento con el tampón control, PEI, pIC o [pIC]^{PEI}, según se indica sobre cada columna de imágenes.

- El panel B muestran las curvas de dosis-respuesta de PEI y pIC, como agentes individuales o en combinación (grupo de barras situado más a la derecha en cada gráfico) observado en células FM (*foreskin melanocytes*: melanocitos de prepucio humano) y SK-Mel-103. La respuesta se expresa como el porcentaje de células muertas medido 24 horas después del tratamiento.

- El panel C muestra un gráfico que representan el porcentaje de muerte celular, estimada mediante exclusión de azul de tripano 24 h después de los tratamientos indicados en las leyendas (Ctrl: ningún tratamiento; PEI: polietilenimina; pIC: ácido poliinosin-policitidílico; [pIC]^{PEI}: ácido poliinosin-policitidílico acompañado con polietilenimina, representado como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes realizados con células del tipo que se indica sobre los gráficos (SK-Mel-103 o fibroblastos de prepucio). Como en el panel A, se observa que sólo las poblaciones de células de melanoma tratadas con [pIC]^{PEI} mueren eficientemente.

Fig. 5. MDA-5 es un sensor y un controlador de la citotoxicidad de $[pIC]^{PEI}$ en células de melanoma.

- El panel A muestra los resultados de la inmunotransferencia de extractos de células SK-Mel-28 (foto superior) y SK-Mel-147 (foto inferior del panel) no tratadas (NT) o tratadas con PEI, pIC, $[pIC]^{PEI}$ o bortezomib (Bor) según se indica sobre los carriles. Los asteriscos corresponden a una banda de fondo. Las flechas indican la posición donde debería observarse la banda de 30 kD indicativa de la escisión de MDA-5.

- El panel B muestra inmunotransferencias donde se muestra el procesamiento de MDA-5 en células SK-Mel-147 sin infectar o infectadas con lentivirus que codifican el shRNA control (carriles encabezados por "sh Control") o el shRNA dirigido contra MDA-5 (carriles encabezados por "sh MDA-5"), visualizado mediante inmunotinción después del tratamiento de las células con pIC, $[pIC]^{PEI}$ o con el tampón control (carriles "NT": no tratadas), según se indica sobre los carriles. Como en el panel A, los asteriscos corresponden a una banda de fondo y las flechas indican la posición donde debería observarse la banda de 30 kD indicativa de la escisión de MDA-5.

- El panel C corresponde al efecto inhibitorio del shRNA dirigido contra MDA-5 sobre la toxicidad dirigida por $[pIC]^{PEI}$ evaluado mediante el porcentaje de muerte celular, determinado mediante exclusión de azul de tripano, observado 24 horas después del tratamiento con pIC desnudo (barras con relleno gris, ■), con el complejo $[pIC]^{PEI}$ (barras con relleno negro, ■) o en células no tratadas (barras sin relleno). Se muestran también los resultados obtenidos en células tratadas con el shRNA control ("sh Control"). Los datos se muestran como medias $\pm$ SEM de tres experimentos independientes.

Fig. 6: Efecto de los inhibidores farmacológicos de la autofagia sobre la actividad citotóxica de $[pIC]^{PEI}$. Colocalización de autofagosomas y lisosomas después del tratamiento con $[pIC]^{PEI}$.

- El panel A muestra el efecto de 3-metiladenina (3-MA) y cloroquina (Chlor) sobre la relocalización de eGFP-LC3 en los autofagosomas, evaluado a partir del porcentaje de células SK-Mel-103 que presentaban focos de fluorescencia debida a GFP-LC3 12 h después del tratamiento con $[pIC]^{PEI}$ (barras con relleno negro) o con el tampón control (barras sin relleno).

- El panel B muestra el efecto inhibitorio de Cloroquina (Chlor), pepstatina A (PEP) o E64d sobre la muerte celular estimada mediante exclusión de azul de tripano 20 horas después del tratamiento con vehículo (barras blancas) o $[pIC]^{PEI}$ (barras negras). Los datos se muestran como medias $\pm$ SEM de tres experimentos independientes.

- El panel C muestra imágenes de fluorescencia de células SK-Mel-103 transducidas con Cherry-GFP-LC3, para detectar la formación de autofagosomas (focos rojos y verdes) y autolisosomas (focos únicamente rojos), tras el tratamiento con $[pIC]^{PEI}$, rapamicina 25 nM o el disolvente control (Control), según se indica sobre cada columna de fotografías.

- El panel D muestra el efecto inhibitorio de bafilomicina 100 μ M (Bafil), Cloroquina 20 μ M (Chlor) o pepstatina A 10 μ g/ml (PEP) sobre la muerte celular estimada mediante exclusión de azul de tripano 20 horas después del tratamiento con vehículo (barras blancas) o $[pIC]^{PEI}$ (barras negras). Los datos se muestran como medias $\pm$ SEM de tres experimentos independientes.

- El panel E muestra imágenes de fluorescencia confocal de células SK-Mel-103 tratadas con $[pIC]^{PEI}$ (fila superior de fotografías) o con $[pIC]^{PEI}$ en presencia de cloroquina (fila inferior de fotografías) y transfectadas de forma estable con eGFP-Rab5 de tipo salvaje (Rab5 wt (wild type) en la figura, columna de fotografías de la izquierda) o bien incubadas con $[pIC]^{PEI}$ marcado con Fluor Red (FluorR en la figura, columna de fotografías intermedia). Puede observarse la internalización de $[pIC]^{PEI}$ por las células de melanoma en ausencia o en presencia de cloroquina.

- El panel F muestra imágenes de fluorescencia confocal que permiten visualizar la proteólisis dependiente de lisosomas por la existencia de escisión y liberación del resto fluorescente de la DQ-BSA (que da lugar a fluorescencia verde, tanto en las células SK-Mel-103 tratadas con el vehículo (Control) como en las tratadas con $[pIC]^{PEI}$. En presencia de cloroquina (Chlor: fila intermedia de fotografías), no se observa señal de fluorescencia en la columna de DQ-BSA (columna intermedia). Se obtuvieron también imágenes simultáneas de las células en presencia de Lysotracker-Red (LTR-Red: columna izquierda de fotografías) para visualizar el compartimento lisosomal, que dio origen a señal en las tres filas de fotografías.

- El panel G muestra un gráfico de barras en el que se representa la colocalización de las señales correspondientes a DQ-BSA y Lysotracker-Red en las células del ensayo del panel F (Ctrl.: control, barras con relleno negro, ■; Chlor: cloroquina, barras sin relleno; $[pIC]^{PEI}$, barras con relleno gris, ■). La colocalización se estimó en un mínimo de 150 células en dos experimentos independientes, y se expresó con respecto al valor obtenido en las células control (u.a.: unidades arbitrarias de fluorescencia).

- El panel H muestra imágenes de inmunofluorescencia confocal de focos de fluorescencia debida a GFP-LC3 (señal verde en el original, indicativa de localización de autofagosomas), y Lysotracker (señal roja en el original,

indicativa de la presencia lisosomas) en SK-mel-103 después del tratamiento con [pIC]PEI o tampón control, según se indica junto a las imágenes. Los núcleos se contratiñeron con Hoescht (fotografías superiores, con señal azul en el original). En la fila inferior se muestra la superposición de las tres imágenes anteriores, en las que se aprecia una señal de color amarillento o anaranjado en las zonas que presentaban señal verde y roja en las imágenes correspondiente a GFP-LC3 y Lysotracker respectivamente, lo que indica que las señales correspondiente a GFP-LC3 y a Lysotracker se localizan en las mismas zonas.

- El panel I muestra imágenes de microscopía confocal en tiempo real tomadas en células SK-Mel-103 que expresaban eGFP-LC3 (señal verde en el original) tratadas o bien con el tampón control con pIC ("Control") o bien con [pIC]^{PEI} e incubadas en presencia de Lysotracker (señal roja en el original) o Hoescht (señal azul en el original) según se indica sobre las imágenes. La superposición de las tres imágenes tomadas (fotografía inferior derecha de cada tratamiento, Control o [pIC]^{PEI}), reveló una fuerte colocalización (señal amarilla) entre GFP-LC3 y lisosomas (tal como era de esperar por la formación de autolisosomas) tras el tratamiento con [pIC]^{PEI} pero no tras el tratamiento con el pIC desnudo de control. En la tercera fila del panel, bajo las imágenes resultado de la superposición, se muestran las gráficas obtenidas al cuantificar en un plano dado de células la intensidad total de fluorescencia en los canales verde (gráfica marcada como "GFP", correspondiente a eGFP-LC3) y rojo (gráfica marcada como "Lyso", correspondiente al Lysotracker). En el caso de las gráficas obtenidas de las células tratadas con [pIC]^{PEI}, la distribución similar tanto de las señales de eGFP-LC3 como de Lysotracker es indicativa de colocalización y, por tanto, de la fusión de autofagosomas y lisosomas.

- El panel J muestra una representación del análisis basado en la población de células SK-Mel-103 tratadas con pIC (Control) o con [pIC], donde se representa la intensidad de la señal de eGFP-LC3 (fluorescencia verde, eje X) y Lysotracker (señal roja, eje Y). Los cuadrados incluyen células con alta tinción dual para ambos marcadores.

Fig. 7: *Tráfico de endosomas y generación y resolución de anfisomas por el tratamiento con [pIC]^{PEI}.*

- El panel A muestra imágenes secuenciales de células de melanoma SK-Mel-103 que expresaban eGFP-Rab7, capturadas por microscopía de fluorescencia en tiempo real, en los tiempos indicados tras el tratamiento con [pIC]^{PEI} o el vehículo control. Se observa que [pIC]PEI dio lugar a la generación de un gran número de vesículas. Los asteriscos marcan las fusiones endosoma-endosoma (a efectos de claridad, se indican sólo algunos ejemplos).

- El panel B muestra fotografías de microscopía confocal obtenidas de células SK-Mel-103 transfectadas de forma estable con retrovirus que daban lugar a fluorescencia verde por expresión de la fusión eGFP-Rab7 wt (Rab7 tipo salvaje) (primera y tercera columna de fotografías contando desde la izquierda, en el segundo caso obtenida en presencia adicional de Lysotracker-Red, según se indica sobre la columna) o la fusión eGFP-Rab7 T22N incubada en presencia de Lysotracker-Red (columna derecha de fotografías). Las células se trataron adicionalmente con [pIC]^{PEI} 10 (fila inferior del panel) o con el vehículo control (fila superior del panel). Las imágenes se capturaron 10 horas después del tratamiento con [pIC]^{PEI}. Las dos columnas de fotografías situadas más a la derecha contienen valores superpuestos que corresponden al área media contenida en vesículas decoradas con Rab7.

- El panel C muestra una secuencia de microfotografías confocales tomadas en los intervalos de tiempo indicados (en segundos) sobre las fotografías, que ilustran la fusión e incorporación de lisosomas a vesículas positivas para Rab7, tras el tratamiento con [pIC]^{PEI}.

- El panel D muestra imágenes de microscopía de fluorescencia obtenidas a tiempo real, de células SK-Mel-103 tratadas con [pIC]^{PEI} y transfectadas de forma estable con retrovirus que daban lugar a fluorescencia verde o roja, según expresaran las fusiones GFP-Rab7 wt (abreviado simplemente GFP-Rab7 junto a la fila correspondiente de fotografías), Cherry-LC3 (abreviado Ch-LC3 junto a la fila de fotografías correspondiente), o que daban lugar fluorescencia azul por haber sido tratadas con Lysotracker-Blue (LTR-Blue en la Figura). Las imágenes se tomaron en los intervalos de tiempo indicados (en minutos) 1 hora después del inicio del tratamiento. Las flechas marcan la primera secuencia en la que se pudo visualizar cada uno de los marcadores indicados.

- El panel E muestra la incorporación de LC3 en la superficie de las vesículas endosómicas con Rab7 previamente a su internalización y posterior degradación. Estas estructuras híbridas endosoma/LC3 (anfisomas) se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia en tiempo real de células SK-Mel-103 que expresaban eGFP-Rab7 o Cherry-LC3 (abreviado Ch-LC3 junto a la fila de fotografías correspondiente).

Fig. 8: *La citotoxicidad de [pIC]^{PEI} es dependiente de la activación de caspasas efectoras y reguladoras.*

- El panel A muestra el porcentaje de muerte celular provocado por el tratamiento de células SK-Mel-147 con tampón control con PEI (Ctr, representado por barras sin relleno), pIC (barras con relleno gris) o el complejo [pIC]^{PEI} (barras con relleno negro), en presencia de los compuestos indicados bajo cada uno de los gráficos: el vehículo (tampón control sin PEI) (gráfico izquierdo), la vitamina E (+VitE, gráfico intermedio) o el inhibidor de caspasas ZVAD-fmk (+ZVAD, gráfico derecho), porcentaje que se cuantificó en todos los casos a partir de la exclusión de azul de tripano.

- El panel B muestra los resultados de las inmunotransferencias de extractos de las líneas celulares de melanoma metastásico indicadas en el lado izquierdo, obtenidas recogiendo las células en los tiempos postratamiento indicados,

en horas, sobre cada carril. Los tratamientos se indican sobre los tiempos: NT (ningún tratamiento: poblaciones de células control incubadas sólo en presencia del tampón disolvente), PEI, pIC, complejo [pIC]^{PEI} o Bor (bortezomib 25 mM). Junto a cada fotografía se indica la proteína analizada: casp-9 (caspasa 9), casp-8 (caspasa 8) o tubulina (control de carga). Los números situados en el lado derecho indican la masa relativa, en kDa, correspondiente a las proteínas que presentan bandas a esa altura.

- El panel C muestra los resultados de las inmunotransferencias de extractos de la línea celular SK-Mel-103, obtenidas recogiendo las células en los tiempos postratamiento indicados, en horas, sobre cada grupo de carriles (24 y 48 horas). Los tratamientos se indican sobre los carriles, bajo los tiempos: NT (ningún tratamiento: poblaciones de células control incubadas sólo en presencia del tampón disolvente), PEI, pIC y complejo [pIC]^{PEI}. Junto a cada fotografía se indica la proteína analizada: casp-9 (caspasa 9), casp-8 (caspasa 8), casp-7 (caspasa 7), casp-3 (caspasa 3) o tubulina (control de carga).

Fig. 9: [pIC]^{PEI} desencadena la apoptosis vía NOXA independientemente del status de p53 y sin inducir la activación compensatoria de MCL-1.

- El panel A muestra fotografías de las inmunotransferencias obtenidas de células SK-Mel-28 (grupo superior de fotografías) o SK-Mel-147 (grupo inferior de fotografías del panel) obtenidas recogiendo las células en los tiempos postratamiento indicados, en horas, sobre cada carril. Los tratamientos se indican sobre los tiempos: NT (ningún tratamiento: poblaciones de células control incubadas sólo en presencia del tampón disolvente), PEI, pIC, complejo [pIC]^{PEI} o Bor (bortezomib 25 mM). Junto a cada fotografía se indica la proteína cuyo nivel se analizó: NOXA, Mcl-1 o tubulina (control de carga).

- El panel B muestra sendos gráficos donde se representan los niveles relativos de Mcl-1 (gráfico superior) y NOXA (gráfico inferior) calculados por densitometría a partir de las inmunotransferencias obtenidas de células SK-Mel-28 en función del tiempo transcurrido desde el tratamiento que se indica en abscisas, representados como el porcentaje referido al valor correspondiente obtenido en las células control sin tratar. Junto a cada curva se indica el tratamiento al que corresponde.

- El panel C muestra fotografías tomadas de inmunotransferencias de extractos celulares totales aislados de células SK-Mel-103, obtenidas recogiendo las células en los tiempos postratamiento indicados, en horas, sobre cada grupo de tratamientos. Los tratamientos se indican sobre cada carril: NT (ningún tratamiento: poblaciones de células control incubadas sólo en presencia del tampón disolvente), PEI, pIC, complejo [pIC]^{PEI} o Bor (bortezomib 25 mM). Junto a cada fotografía se indica la proteína cuyo nivel se analizó: NOXA, Bcl-xL, Bcl-2 o tubulina (control de carga). En la parte inferior del panel se indica, bajo cada carril, el porcentaje de muerte celular observado según el tiempo postratamiento y el tratamiento.

- El panel D muestra fotografías de inmunotransferencias dirigidas a evaluar la expresión de la proteína NOXA, obtenidas de células de melanoma SK-Mel-103 tratadas durante 24 h con pIC o [pIC]^{PEI} dos días después de la infección con un vector lentiviral que expresaba un shRNA inactivo shRNA (sh Ctrl) o un shRNA dirigido contra NOXA.

- El panel E muestra un gráfico donde se representan las tasas de muerte de células de melanoma SK-Mel-103 (expresada como porcentaje de células muertas), transducidas bien con un shRNA control (barras con relleno gris claro, ■■■) o con un shRNA dirigido contra NOXA (barras con relleno negro, ■■■) e incubadas con pIC o [pIC]^{PEI} durante 24 h (NT: ningún tratamiento, células incubadas sólo con el vehículo de administración).

- El panel F corresponde al efecto inhibitorio de la regulación a la baja de MDA-5 sobre la inducción de NOXA por [pIC]^{PEI}, representado por los niveles de NOXA (expresados en unidades arbitrarias, u.a.) determinados en células SK-Mel-103 transducidas con shRNAs control o un shRNA dirigido contra MDA-5. Los niveles de NOXA se cuantificaron por densitometría de la correspondiente inmunotransferencia y se representaron con respecto a los controles sin tratar (N Inf: ninguna interferencia, niveles a los que les dio el valor 1 en el caso del tratamiento con pIC desnudo y de 100 en el caso del tratamiento con [pIC]^{PEI}).

Fig. 10: Actividad anti-melanoma de [pIC]^{PEI} en ratones inmunocompetentes.

- El panel A se refiere a la generación de xenoinjertos subcutáneos de células de melanoma B16 en ratones singénicos C57BL/6. En la parte superior se esquematiza la estrategia experimental, con los tiempos de tratamiento en los que se produjeron las inyecciones peritumorales de 2 ng/kg de pIC desnudo o acompañado con PEI (grupo [pIC]^{PEI}), sólo PEI o 100 µl de glucosa al 5% (grupo NT: ningún tratamiento); inmediatamente debajo se representa el crecimiento de tumores observado en cada caso, expresado como el volumen de tumor, en milímetros cúbicos, medido en los días indicados con un calibre.

- El panel B se refiere a la implantación intravenosa de células de melanoma B16-eGFP en ratones C57BL/6. En la parte superior del panel se esquematiza la estrategia experimental, con los tiempos de tratamiento intravenoso posterior a la implantación con 1 ng/kg de pIC o el complejo [pIC]^{PEI}, PEI en glucosa al 5% o glucosa al 5% sin ningún otro compuesto (grupo NT: ningún tratamiento), en los momentos indicados. Inmediatamente debajo se muestran imágenes de fluorescencia obtenidas de pulmones de ratones sometidos a cada uno de los tratamientos indicados.

- El panel C muestra un gráfico de barras en el que se representa el número de metástasis de pulmón observado en cada uno de los grupos de tratamiento del ensayo del panel B, obtenido por recuento de metástasis externas, ($P^* < 0,01$ entre NT/PEI y $[pIC]^{PEI}$; $n=5$; ensayo generalizado de Mann-Whitney).

5 Fig. 11: *IFN- α es inducido por $[pIC]^{PEI}$ pero no es suficiente para provocar la muerte de las células de melanoma.*

- El panel A muestra sendos gráficos en los que se representan los niveles relativos de mRNA de IFIT-1, estimados mediante PCR cuantitativa, expresados con respecto al mRNA detectado en las células control sin tratar (NT), determinados en células de melanoma B16 (gráfico izquierdo) o macrófagos BMD (derivados de médula ósea) (gráfico de la derecha), tras el tratamiento con pIC o $[pIC]^{PEI}$.

- El panel B corresponde a la tasa de muerte celular observada al tratar células de melanoma SK-Mel-103 con las concentraciones indicadas en abscisas de IFN- α humano recombinante, determinada a las 24 horas del tratamiento. Como controles, las células se trataron en paralelo con pIC desnudo y $[pIC]^{PEI}$ (pareja de barras situadas más a la derecha). Nótese que los niveles elevados de IFN- α no son citotóxicos para las células de melanoma, y no pueden reproducir la eficacia de la mortalidad provocada por $[pIC]^{PEI}$.

- El panel C muestra los valores de los logaritmos en base 2 de las relaciones de los genes inducidos por IFN alterados por el tratamiento con pIC o $[pIC]^{PEI}$ estimados con respecto a células control tratadas con PEI, en los tiempos indicados.

Fig. 12: *Inhibición de la diseminación de metástasis mediante $[pIC]^{PEI}$ en ratones inmunocomprometidos.*

- El panel A muestra fotografías tomadas bajo luz visible (fila superior) o fluorescente (fila inferior) de pulmones representativos de ratones Beige con SCID (inmunodeficiencia combinada severa) inoculados i.v. con células de melanoma B16, y tratados con PEI, pIC o $[pIC]^{PEI}$ según se indica sobre las fotografías. Las imágenes se capturaron 14 días después de la inyección de células.

- El panel B muestra un gráfico de barras en el que se representa el número medio de metástasis inducidas por B16 en cada uno de los grupos de ratones Beige con SCID del panel A ($P^* < 0,01$ entre los grupos de tratamiento con PEI o pIC y $[pIC]^{PEI}$; $n=5$; ensayo generalizado de Mann-Whitney).

- El panel C corresponde al análisis histológico de metástasis de pulmón desencadenadas por melanoma B16 en los grupos de tratamiento de los paneles A y B. Se muestran tinciones representativas con hematoxilina y eosina de muestras de pulmón tomadas de ratones correspondientes a los tratamientos indicados sobre las imágenes, que se visualizan a dos aumentos diferentes (10x y 40x).

- El panel D muestra fotografías de muestras representativas de pulmones de ratones Beige con SCID inoculados i.v. con células de melanoma SK-Mel-103 y tratados con PEI, pIC o $[pIC]^{PEI}$ según se indica sobre las fotografías. Las imágenes se tomaron bajo luz fluorescente (fila superior) o con luz visible tras tinción de la muestra con hematoxilina y eosina (H & E) (fila inferior).

- El panel E muestra un gráfico de barras en el que se representa el número medio de metástasis de pulmón inducidas por las células SK-Mel-103 cuantificadas en cada uno de los grupos de ratones Beige con SCID del panel D. ($P^* < 0,01$ entre los grupos de tratamiento con PEI o pIC y $[pIC]^{PEI}$; $n=5$; ensayo generalizado de Mann-Whitney).

Fig. 13: *Inhibición de la diseminación de metástasis mediante $[pIC]^{PEI}$ en ratones $Tyr::NRAS^{Q61K} \times INK4a/ARF^{-/-}$.*

50 - El panel A muestra un gráfico de Kaplan-Meier correspondiente a la supervivencia libre de progresión de metástasis de ratones $Tyr::Ras^{Q16K} \times INK4a/ARF^{-/-}$ tratados con DMBA para provocar lesiones pigmentadas y tratados entonces con PEI en glucosa al 5% (Control: Ctrl.), pIC o $[pIC]^{PEI}$.

55 - El panel B muestra gráficos de barras acumulativas correspondientes al número medio de neoplasmas melanocíticos cutáneos desarrollados por cada uno de los grupos de ensayo del panel A. El recuento se realizó cada 5 días y los tumores se agruparon por intervalos de tamaño según se indica sobre los gráficos.

- El panel C presenta imágenes representativas de secciones transversas (columna de la izquierda) o coronales (columna de la derecha) obtenidas mediante PET/CT encaminada a ensayar la actividad metabólica (incorporación de ^{18}F -FDG), de ejemplos representativos de ratones tratados con PEI en glucosa al 5% (control), pIC desnudo o $[pIC]^{PEI}$. Los tumores aparecen rodeados por líneas blancas discontinuas. Los asteriscos indican la posición de los corazones de los animales.

65 - El panel D muestra tinciones de hematoxilina - eosina de muestras de lesiones melanocíticas extraídas de cada uno de los grupos de tratamiento descritos en el panel A.

- El panel E muestra tinciones de hematoxilina - eosina de muestras de tejido tomadas de piel, corazón, hígado o pulmón (según se indica a la izquierda de las fotografías) de ratones tratados con el vehículo glucosa al 5% (Control)

o con [pIC]^{PEI} que demuestran la ausencia de toxicidad asociada al tratamiento con [pIC]^{PEI} en los compartimentos de células normales.

Ejemplos

Los ensayos que forman parte de los Ejemplos que se describen a continuación se llevaron a cabo con los siguientes materiales y técnicas experimentales:

- Células y cultivo de las mismas

Las líneas celulares de melanoma metastásico humano SK-Mel-19, SK-Mel-28, SK-Mel-103 y SK-Mel-147 y las células de ratón B16 ya han sido descritas (Soengas *et al.* 2001). Estas células se cultivaron en medio DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) (Life Technologies, Rockville, MD, USA) suplementado por suero bovino fetal al 10% (Nova-Tech Inc., Grand Island, NY, USA).

Los melanocitos humanos, se aislaron de prepucios de recién nacidos humanos tal como se ha descrito (Fernández *et al.*, 2005) y se mantuvieron en Medio 254 suplementado con factores de crecimiento de melanocitos (HMG-1) que contenían 10 ng/ml de 12-miristato-13-acetato de forbol (Cascade Biologics, Portland, OR, USA).

Los fibroblastos humanos se aislaron de prepucios de recién nacidos humanos y se mantuvieron en medio DMEM con suero bovino fetal al 10%.

- Generación de pIC acomplejado con PEI

El análogo sintético del dsRNA, pIC, se adquirió a InvivoGen (San Diego, CA). Los reactivos jetPEITM, jetPEI-FluorTM y la formulación invivo-jetPEITM se adquirieron... a Polyplus-transfection (Ikirch, Francia) Estos últimos reactivos, que contienen un derivado lineal de la polietilenimina, se utilizaron para acomplejar pIC en una relación N/P (residuos de nitrógeno de JetPEI por fosfato de RNA) de 1 a 5 *in vitro* e *in vivo*, siguiendo las instrucciones del fabricante.

A menos que se indique de otra manera, las concentraciones de pIC utilizados en los cultivos de células fueron de 1 µg/ml, y de 1-2 ng/kg en ratones.

- Tratamientos con fármacos y ensayos de muerte celular

El bortezomib (Velcade, anteriormente PS-341) se obtuvo de Millenium Pharmaceuticals Inc (Cambridge, MA); la adriamicina (doxorubicina) de Sigma Chemical (St. Louis, MO), y el etopósido de Bristol-Myers Squibb (Nueva York, NY). El antioxidante Tiron y la Vit-E se adquirieron a Sigma (St. Louis, MO), y el inhibidor general de caspasas ZVAD a R&D System (Minneapolis, MN). La 3-metiladenina (3-MA) se obtuvo de Sigma Chemical (St. Louis, MO). La cloroquina se obtuvo de Sigma Chemical (St Louis, MO, USA).

Los ensayos de viabilidad celular en respuesta a los tratamientos con fármacos se realizaron tras sembrar melanocitos y células de melanoma al menos 12 horas antes del tratamiento con fármacos. El porcentaje de muerte celular en los tiempos y concentraciones de tratamiento indicados se estimó mediante ensayos estándar de exclusión de azul de tripano tal como se ha descrito previamente (Wolter *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2005).

- Inmunotransferencia de proteínas

Para determinar cambios a nivel de las proteínas, se trataron 2x10⁶ células tal como se ha indicado y se recogieron a diferentes tiempos tras el tratamiento. Los Usados totales de células se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS al 10%, 12% o en gradientes del 4-15% en condiciones reductoras, y seguidamente se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA, USA). Las bandas de proteínas se detectaron mediante el sistema ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Los anticuerpos primarios incluían: casp-9 y casp-3 de Novus Biological (Littleton, CO, USA); casp-8 (Ab-3) de Oncogene Research Products (San Diego, CA, USA); casp-7 de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA); casp-7 de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA); Bcl-xL de BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, NJ, USA); Bcl-2 de Dako Diagnostics (Glostrup, Dinamarca); NOXA de Calbiochem (San Diego, CA, USA); LC3 de Cell Signaling (Danvers, MA, USA); p53 de Novocastra Laboratories (Newcastle, UK); y α-tubulina (clon AC-74) de Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). El anticuerpo anti-MDA-5 se ha descrito anteriormente (Barral *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2004).

Los anticuerpos secundarios fueron anticuerpos anti-ratón o anti-conejo de GE Healthcare. Para cuantificar los cambios en los niveles de proteínas inducidos mediante los diferentes tratamientos se utilizó Image J, considerando los controles sin tratar como referencia para la expresión basal.

- RNA de interferencia

El vector lentiviral con RNA utilizado para regular NOXA a la baja se ha descrito previamente (Fernández *et al.*, 2005). El vector lentiviral pLKO-shRNA, utilizado para regular a la baja MDA-5 (secuencia diana, SEQ ID NO:1: CGCAAGGAGTTCCAACCATTT) se adquirieron a OpenBiosystems (Huntsville, AL). También se diseñaron oligonucleótidos mezclados para generar el shRNA control. Los virus se generaron a partir de los vectores lentivirales mencionados en células 293FT, tal como ha sido descrito, y se utilizaron en condiciones que daban lugar a una eficacia de infección > 80% (Denoyelle *et al.*, 2006). La regulación a la baja de MDA-5 se confirmó mediante inmunotransferencia y RT-PCR (cebador directo SEQ ID NO:2, 5' GGC ACC ATG GGA AGT GAT T 3'; cebador inverso, SEQ ID NO:3: 5' ATT TGG TAA GGC CTG AGC TG 3'. Cuando se indica así, el tratamiento con pIC o [pIC]^{PEI} se inició a los 3 días después de la infección con los correspondientes virus que expresaban el shRNA.

- Microarrays de perfiles de expresión

Se aisló el RNA total de al menos dos experimentos independientes y se purificó con el kit Rneasy (Quiagen). Se marcaron con Cy5-dUTP 2,5 µg de muestras tratadas 5 con PEI y se utilizaron como referencia en las reacciones de hibridación con 2,5 µg del RNA marcado con Cy3-dUTP resultante de la incubación con pIC o PEI. El RNA marcado se hibridó con el Microarray de oligos de dos colores del genoma humano completo (4x44K) de Agilent (Santa Clara, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de lavar, los portaobjetos se escanearon utilizando un Scanarray 5000 XL (GSI Lumonics Kanata, Ontario, Canadá) y las imágenes se analizaron con el programa GenePix 4.0 (Axon Instruments Inc., Union City, CA), esencialmente tal como se ha descrito previamente (Alonso *et al.*, 2007). Las medidas de la intensidad de fluorescencia se sometieron a la sustracción automática del fondo. Las relaciones Cy3: Cy5 se normalizaron al valor de la mediana de la relación de todos los puntos del array. Después de la normalización, se descartaron los puntos con intensidades para ambos canales (suma de medianas) menores que el fondo local. Las relaciones de los restantes puntos fueron objeto de transformación logarítmica (base 2), y los puntos duplicados en los arrays se ajustaron a la mediana. El agrupamiento de pares no ponderado (UPGMA: *unweighted pair-group*) de los genes expresados de forma diferencial entre las muestras control y de ensayo se llevó a cabo con el Gene Expresión Pattern Análisis Suite (GEPAS).

- Ratones y respuesta al tratamiento in vivo

Los ratones C57BL/6 hembra se adquirieron al NIH (Bethesda, MA). Los ratones Beige hembra con SCID (*severe combined immunodeficiency*: inmunodeficiencia combinada severa), que tienen afectada la función de los linfocitos NK, T y B, eran de Charles Rivers (Wilmington, MA). Todos los animales eran de 6-12 semanas de edad al comienzo de los experimentos. El cuidado de los animales se prodigó de acuerdo con los procedimientos institucionales del Centro del Cáncer de la Universidad de Michigan.

Los injertos en la piel se generaron mediante inyección intracutánea de 10⁵ células de melanoma B16. 2 ng/kg de pIC, solo o acompañado con *in vivo*JetPEITM se administraron mediante inyecciones peritumorales en los días 7, 11, 15 y 21 posteriores a la implantación del tumor. Los grupos adicionales de tratamiento incluyeron JetPEI como agente único y controles con placebo. El volumen de los tumores se estimó mediante medidas con un calibrador y se calcularon como $V = L \times W^2/2$, donde *L* y *W* indican la longitud y la anchura del tumor, respectivamente. Se analizaron 10 tumores por grupo experimental. De forma rutinaria, los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor excedió de 1000 mm³.

Los modelos sustitutorios de metástasis pulmonar se generaron mediante inyección intravenosa (i.v.) de 4x10⁵ células de melanoma B16-eGFP o 5x10⁵ células de melanoma SK-Mel-103-eGFP (SK-Mel-103 infectadas con el vector pLVO-eGFP-LC3 tal como se describe más adelante). El tratamiento se llevó a cabo los días 3, 6, y 9 mediante inyección i.v. de 1 ng/kg de pIC solo o acompañado con *in vivo*JetPEI. Los grupos de control sin PEI recibieron PEI en 5% de glucosa, mientras que el grupo sin tratamiento (NT) recibió 5% de glucosa sin PEI. 14 días después de la inoculación de las células, se sacrificaron los ratones, y se procesaron sus pulmones para obtener imágenes de fluorescencia; las metástasis externas se contaron manualmente y se les asignó un valor según su número y tamaño. Alternativamente, se utilizó un sistema Illumatool TLS LT-9500 de luz de fluorescencia (Lighttools Research, Encinitas, CA, USA) y la fluorescencia emitida por las células tumorales se capturó con una cámara Hamamatsu Orea 100 CCD. La implicación de metástasis se siguió de forma independiente mediante análisis de la tinción con hematoxilina-eosina de secciones de parafina. Los experimentos se llevaron a cabo en grupos de cinco ratones y se repitieron de dos a cuatro veces. Los ratones se sometieron a eutanasia cuando las poblaciones control mostraron signos de malestar o defectos respiratorios.

Los melanomas autóctonos se generaron cruzando los ratones Tyr::N-Ras^{Q61K} con ratones *knockout* en Ink4a/Arf en un contexto C57BL/6 (Ackermann *et al.*, 2005). Para la inducción del melanoma en la piel, los ratones se pintaron una vez, a la edad de 8-10 semanas, con 220 µg de 7,12-dimetilben[*a*]antraceno (DMBA). Tras el desarrollo de los primeros neoplasmas melanocíticos (lesiones de al menos 1 mm de diámetro), los ratones se trataron 2 veces por semanas con inyecciones intraperitoneales de 1 ng/kg de pIC como agente individual o acompañado con *in vivo*JetPEI. Se contaron los melanomas y los lunares (neví) y se midió su tamaño en dos diámetros biseccionantes utilizando un calibre, expresándolo como tamaño medio tumoral, en mm³.

El tamaño de los tumores se evaluó también mediante PET-CT (*Positron Emission Tomography-Computed Tomography*: Tomografía de Emisión de Positrones - Tomografía Computada). La exploración y adquisición de imágenes de PET-CT se llevó a cabo con el sistema de PET-CT para animales pequeños Explore Vista de General Electric (Fairfield, CT, USA). Se inyectaron 15 MBq de ^{18}F -FDG (2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa) para la adquisición de imágenes de PET y se reconstruyeron las imágenes mediante el algoritmo 3DOSEM. Las imágenes de CT se adquirieron con 16 disparos con una energía de 35 KeV y 200 μA , y las imágenes se reconstruyeron utilizando el algoritmo FDK. Los melanomas, las metástasis y otros órganos se monitorizaron independientemente mediante el análisis de secciones de parafina teñidas con hematoxilina-eosina.

10 - Microscopía electrónica de transmisión

Para la microscopía electrónica de transmisión (TEM), las poblaciones de células indicadas se lavaron con tampón de Sorensen 0,1, pH 7,5 y se fijaron en glutaraldehído al 2,5% durante 1,5 h, y a continuación se deshidrataron y se embebieron en resina de Spurr. Luego, el bloque se seccionó en secciones ultrafinas de 60-100 nm, que se picaron sobre rejillas de cobre. Para realizar el análisis rutinario, las secciones ultrafinas se tiñeron con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo. Las micrografías electrónicas se tomaron con un microscopio de transmisión Philips CM-100 (FEI, Hillsbrough, OR) y una cámara digital Kodak 1.6 Megaplex.

20 - Microscopía confocal y de fluorescencia: Cuantificación de los puntos dispersos de GFP-LC3

La fusión eGFP-LC3 clonada en el vector de expresión pCNA fue un donativo de Gabriel Núñez (Centro del Cáncer de la Universidad de Michigan). Dicha fusión eGFP-LC3, así como los fragmentos de secuencia correspondientes a las fusiones eGFP-Rab7wt, eGFP-Rab7 T22N, eGFP-Rab5wt, eGFP-Cherry-LC3 y Cherry-LC3 se clonaron en sendos vectores lentivirales pLVO-puro para conseguir una transferencia estable de genes mediada por lentivirus. Las células derivadas de melanoma (SK-Mel-103, por ejemplo) se infectaron con el vector resultante (pLVO-GFP-LC3, por ejemplo) y se seleccionaron con puomicina. La emisión de fluorescencia asociada a GFP-LC3 se visualizó utilizando un microscopio de fluorescencia Leica AF6000 y las imágenes se analizaron mediante LAS AF V1.9 (Leica, Solms, Alemania). Para realizar la microscopía confocal en tiempo real, se utilizó un microscopio ultraespectral Leica TCS-SP2-AOBS-UV acoplado a CO₂ y una cámara de incubación a temperatura controlada. Las imágenes se analizaron mediante LCS (Leica, Solms, Alemania). Para los experimentos de colocalización se añadió el LysoTracker™ Red (Invitrogen, Carlsbad, CA), o LysoTracker™ Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA), a concentraciones finales, respectivamente, de 50 nM o 200 nM, añadidos 1 hora antes de la obtención de imágenes, así como Hoescht 33342 (Invitrogen, Carlsbad, CA), añadido a una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 minutos antes de la obtención de imágenes. Las imágenes de colocalización se analizaron con LAS AF V1.9 (Leica, Solms, Alemania).

35 - Expresión de citoquinas

El interferón alfa humano se midió en sobrenadantes de cultivo mediante ensayo inmunoabsorbente de enzimas ligadas (ELISA). El kit de ELISA de IFN- α humano y el hIFN- α recombinante se adquirieron a PBL Interferon Source (Piscataway, NY) y se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de expresión del IFN- α/β se midió en macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) y células de melanoma B16 mediante PCR a tiempo real. Los BMDMs se prepararon, plaquearon y trataron tal como ha sido previamente descrito (Celada *et al.*, 1984). El análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los transcritos de RNA de IFIT-1 (proteína 1 inducida por interferón con repeticiones del tetratricopéptido) se llevaron a cabo utilizando cebadores y sondas TaqMan obtenidas de Applied Biosystems en un detector de secuencias 770 de Applied Biosystems tras la normalización con β -actina.

- Análisis estadísticos

Los datos de viabilidad se expresaron como medias $\pm$ s.e.m, y el análisis estadístico de las diferencias se determinó mediante el ensayo de la t de Student para dos muestras. Se consideró significativo $P < 0,05$. Para la evaluación estadística del crecimiento de los tumores y las metástasis *in vivo*, se utilizó el ensayo generalizado de Mann-Whitney Wilcoxon para comparar los valores de variables continuas entre dos grupos. Se consideraron significativos los valores de $P < 0,05$.

55 - Ejemplo 1

Identificación de inductores de autofagia en células de melanoma por un análisis discriminatorio de fluorescencia basado en LC3. Confirmación de la muerte celular autofágica inducida por [pIC]^{PEI} mediante análisis ultraestructurales

Tal como se ha comentado previamente, un rasgo distintivo de la autofagia (tanto para inducción de la muerte celular como de la supervivencia), es la relocalización de la proteína del gen de autofagia 8 (ATG8)/LC3 desde el citosol a autofagosomas de reciente formación. Basándose en esta observación, los cambios en la distribución celular de una proteína de fusión GFP-LC3 (p. ej. de un patrón difuso a la tinción focal) son ampliamente utilizados como un sustituto de estadios tempranos de autofagia. La presencia de autofagosomas puede confirmarse también mediante microscopía electrónica o microscopía de campo claro.

1.1. Análisis de fluorescencia basado en LC3

Para comenzar a abordar el papel de la autofagia en la respuesta del melanoma a los fármacos, se llevó a cabo un análisis discriminatorio basado en GFP-LC3 con fármacos quimioterapéuticos e inmunomoduladores comercialmente disponibles. Las células de melanoma se transdujeron de forma estable con vectores lentivirales capaces de expresar derivados del marcador de autofagosomas LC3 marcados con GFP, tales como el vector pLVO-eGFP-LC3. La línea celular humana SK-Mel-103 se seleccionó como el sistema modelo de células de melanoma para el estudio discriminatorio inicial, basándose en su fenotipo altamente metastásico y quimiorresistente (Soengas *et al.*, 2001). Se llevaron a cabo estudios de validación posteriores en un panel de líneas celulares de diverso fondo genético (véase más adelante).

Se encontró que diversos fármacos anticancerígenos inducían la emisión focal de fluorescencia asociada a GFP-LC3 sin afectar de forma significativa a la viabilidad celular. Sin embargo, entre los inductores de muerte celular, se encontró que un complejo de PEI y el compuesto análogo de dsRNA ácido polinosin-policitidílico, [pIC]^{PEI}, era particularmente eficaz, dando lugar a una fuerte acumulación de focos GFP-LC3. Aproximadamente 50% de las células mostraron una tinción de GFP-LC3 en forma de puntos continuos perceptibles dentro de las 4-6 h de incubación con dosis bajas (0,5-1 µg/ml) de [pIC]^{PEI} (véanse los micrográficos representativos y la cuantificación en la Fig. 1A y B, respectivamente). De hecho, los análisis cinéticos indicaron una generación más rápida de focos de GFP-LC3 por [pIC]^{PEI} que por rapamicina (Fig. 1B), un control positivo clásico de la inducción de autofagia (Klionsky *et al.*, 2008). Es interesante que en los momentos más tardíos del tratamiento con [pIC]^{PEI} se obtuvo como resultado muerte celular, incluso en las líneas celulares que son intrínsecamente resistentes a agentes normales lesivos para el DNA tales como doxorubicina o etopósido, como es el caso de la línea SK-Mel-103). El análisis de la proteína LC3 endógena mostró cambio en su movilidad electroforética (Fig. 1C), característicos de la lipidación de esta proteína durante autofagia, y un requerimiento estricto de ATG5 para la formación de focos GFP-LC3.

Los autores, de la invención no tenían conocimiento de ningún informe previo que hubiera ligado el pIC a la autofagia en células cancerígenas. Por ello, centraron los siguientes ensayos en este compuesto, puesto que podría revelar nuevos elementos para aumentar la comprensión del potencial de los sensores intracelulares de dsRNA para inducir autofagia y muerte de células tumorales.

1.2. Análisis ultraestructurales del efecto de [pIC]^{PEI} sobre las células

La tinción focal de GFP-LC3 de células tratadas con [pIC]^{PEI} descrita en el apartado anterior es consistente con la formación de autofagosomas. Sin embargo, para descartar posibles agregaciones inespecíficas e independientes de autofagia de esta proteína de fusión (Klionsky *et al.*, 2008), la respuesta de las células de melanoma a [pIC]^{PEI} se analizó independientemente mediante microscopía electrónica (Fig. 1D).

Las respuestas tempranas (5 h) a [pIC]^{PEI} implicaban una marcada acumulación de estructuras densas frente a los electrones, unidas a la membrana, en las que habían quedado secuestrados restos celulares (Fig. 1D), un rasgo distintivo de autofagosomas. El tamaño y número de estas estructuras era visible como gránulos intracelulares incluso mediante microscopía óptica (Fig. 1E).

En los momentos tardíos, el tratamiento con [pIC]^{PEI} condujo al colapso celular (Fig. 1F, panel intermedio), el cual se encontró mediante microscopía electrónica que estaba asociado con la formación de grandes vacuolas fagocíticas, de más de 500 nm de diámetro (Fig. 1F, panel derecho): la inducción de estructuras multivesiculares grandes resultó ser una característica estructural definitoria de la acción de [pIC]^{PEI} sobre las células de melanoma. La muerte de células de melanoma finalmente producida fue en todos los casos el resultado de activación previa de vesículas autofagocíticas clásicas. La Fig. 2 muestra un resumen de la evolución en el tiempo de la inducción de la autofagia, mediante microfotografías de fluorescencia seleccionadas tomadas en distintos tiempos, microfotografías en donde puede observarse la redistribución de eGFP a lo largo del tiempo: de una tinción difusa a agregados focales, indicativos de la formación de autofagosomas, proceso que culmina con un colapso celular generalizado; las células control mostraron una tinción difusa durante todo el tiempo de ensayo, indicativo de niveles basales de acumulación de LC3.

Es interesante que la integridad de las membranas plasmática y nuclear se mantuvo, y que las células tratadas con [pIC]^{PEI} mostraban la condensación de la cromatina característica de los programas de apoptosis. La inducción de autofagia era dependiente de pIC, pues PEI (Control) tuvo un impacto mínimo en el número o el tamaño de los autofagosomas (Fig. 1D-F). En conjunto, estos resultados apoyan un efecto citotóxico de [pIC]^{PEI} que implica la formación de autofagosomas, seguido de deceso celular con rasgos similares a los apoptóticos.

- Ejemplo 2

Análisis de la sensibilidad de distintas líneas celulares de melanoma humano y murino a pIC conjugado con moléculas catiónicas y selectividad frente a los melanocitos

Para determinar si la actividad pro-autofágica de [pIC]^{PEI} hallada en el estudio discriminatorio inicial realizado con células SK-Mel-103 era un reflejo de una actividad anti-melanoma más amplia, se realizaron ensayos sobre un juego adicional de líneas celulares. Se seleccionaron casos que representan defectos genéticos o epigenéticos asociados con el melanoma en oncogenes (*BRAF*, *NRAS*), supresores de tumores (*p16*, *p19*, *PTEN*) y factores pro y antiapoptóticos (familia de Bcl-2), que se sabe que contribuyen a la progresión del melanoma y a su quimiorresistencia.

Las mutaciones en *p53* son raras en melanoma (Soengas and Lowe, 2003). Sin embargo, puesto que *p53* puede jugar un papel clave en la activación de programas apoptóticos y autofágicos, también se realizaron ensayos con SK-Mel-28, una línea celular que expresa una *p53* mutante, para determinar si este supresor de tumores se requiere estrictamente para la actividad antimelanoma de [pIC]^{PEI}. Además, también se incluyó en el análisis una variante metastásica de la línea celular de melanoma de ratón B16, como ejemplo de modelo ampliamente utilizado en la inmunoterapia del melanoma (Wenzel *et al.*, 2008), para evaluar diferencias en la respuesta al tratamiento supuestamente asociadas a las diferencias entre especies. En paralelo, se analizaron también melanocitos aislados de prepucio humano.

El contexto genético de las líneas de melanoma metastásico humano utilizadas se muestra en la Tabla 1:

TABLA 1

Contexto genético de las líneas de melanoma metastásico humano

Línea celular	p53	Induc. p53	p14 (mRNA)	p16 (mRNA)	BRAF (V599)	NRAS (exón 3)	PTEN (prot)	Apaf-1 (prot)	Casp8 (prot)	Bcl-2 (prot)	Bcl-xL (prot)	Mcl1 (prot)	DOX
SK-Mel-19	Tipo silv.	+	+	+ ^{***}	mut.	Tipo silv.	-	++	++	+++	++	ND	++
SK-Mel-28	L145R	-*	ND	+ ^{***}	mut.	Tipo silv.	+	-/+	++	++	++	++	-
SK-Mel-103	Tipo silv. ^R	+	+	+	Tipo Silv.	Q61R	+	-	+	++	+++	+++	-
SK-Mel-147	Tipo silv. ^R	+	-	+ ^{***}	Tipo silv.	Q61R	+	-	+	++	+++	+++	-

La presencia de mutaciones (mut.) en *p53* se determinó por secuenciación directa de los exones 2-10 por RT-PCR. Las muestras con el polimorfismo P72R se indican como ^R. La inducibilidad de *p53* (Induc. *p53*) se determinó mediante inmunotransferencia de extractos tratados con doxorrubicina (0,5 μ g/ml, 12 h). Las líneas con altos niveles endógenos de *p53* se indican con un asterisco. Los niveles de PTEN, Apaf-1, Casp-8, Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1 se determinaron por inmunotransferencia y se normalizaron con respecto a los melanocitos control. La presencia de mutaciones en BRAF y NRAS se determinó por secuenciación directa de fragmentos genómicos amplificados por PCR de los exones 15 y 3, respectivamente. Las respuestas a doxorrubicina (DOX; 0,5 μ g/ml, 30 h) se catalogaron como ++, +, -/+, -, según los porcentajes de muerte celular fueran de 100-70, 70-50, 50-30 y <30%, respectivamente.

Con estas líneas, se llevaron a cabo ensayos similares a los descritos en el Ejemplo 1 para la línea celular SK-Mel-103, para comprobar la sensibilidad de cada una de estas células a PEI y pIC como agentes independientes o utilizados en combinación. Los resultados se resumen en la Fig. 3.

Las cinco líneas celulares de melanoma ensayadas (SK-Mel-19, -28, -103, -147, y B16) murieron con una cinética y sensibilidad similares después del tratamiento con [pIC]^{PEI} (Fig. 3A). Es significativo que en todas las líneas de melanoma en las que se realizó el ensayo, la activación temprana de la autofagia por parte de [pIC]^{PEI} fue invariablemente seguida por muerte celular.

La microscopía electrónica mostró autofagosomas claros, también en el caso de la línea mutante en *p53*, SK-Mel-28 (Fig. 3B). Como puede apreciarse en la Fig. 3A y en las curvas de dosis-respuesta representadas en la Fig. 4B (que muestra los datos representativos de las líneas correspondientes a cuatro aislados independientes), es importante señalar que, en condiciones que provocaron la muerte del 70% de las células de melanoma SK-Mel-103 24 horas después del tratamiento, los melanocitos normales siguieron siendo viables y no mostraron marcadores de autofagia.

Es más, como puede apreciarse en la Fig. 4A, no se observaron cambios significativos en la morfología, la granulación citosólica o la distribución de GFP-LC3 en los melanocitos a lo largo de un amplio rango de concentraciones de [pIC]^{PEI}. La Fig. 4C es indicativa también de que los fibroblastos normales de piel humana también resultaron ser más resistentes a [pIC]^{PEI} que las células de melanoma.

Los arrays de cDNA mostraron que los melanocitos experimentaban cambios mínimos en la expresión de genes en momentos tempranos (4 horas) o tardíos (10 horas) después del tratamiento, independientemente de si eran tratados con pIC desnudo o con el complejo [pIC]^{PEI}; por el contrario, las células de melanoma respondieron con alteraciones sustanciales en su transcriptoma. Es interesante señalar que la respuesta al pIC desnudo fue bastante transitoria, mientras que el efecto de [pIC]^{PEI} fue sostenido.

Es interesante haber encontrado que PEI es crítico en su selectividad por las células tumorales. Así, la actividad antimelanoma de pIC se redujo en un 70-80% cuando no se incluía PEI en el tratamiento (Fig. 3A). Sin PEI, el pIC desnudo fue casi tan ineficaz en las células de melanoma como en los melanocitos, y mostraba una actividad mínima como inductor de proautofagia (Fig. 3B).

PEI es un vehículo clásico en terapia génica por su capacidad para favorecer la captación por endocitosis de moléculas de DNA y RNA (revisado en Payne, 2007). Las estructuras multilamelares encontradas en las células de melanoma tratadas con [pIC]^{PEI} (véanse las fotografías inferiores de la Fig 2B), son de hecho consistentes con múltiples eventos de fusión que implican la llegada de híbridos endosoma-lisosoma (anfisomas) a los autofagosomas (Maiuri *et al.*, 2007).

- Ejemplo 3

Activación de MDA-5 por pIC de forma cualitativamente diferente en ausencia o en presencia de PEI

Además de favorecer la endocitosis de las moléculas de DNA o RNA, PEI puede promover el hinchamiento de los endosomas y permitir una entrega eficiente del material genético al citosol (revisado en Payne, 2007). Por ello, se pensó que PEI podría favorecer el acceso de pIC a sus sensores intracitosólicos. El gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma (MDA-5) es uno de estos sensores (Akira, 2006), y por ello, los autores de la invención realizaron ensayos para comprobar si esta proteína era la que desencadenaba la muerte de células de melanoma mediada por [pIC]^{PEI}.

La activación de MDA-5 se analizó realizando un seguimiento de la ruptura proteolítica que separa su dominio helicasa y su dominio de reclutamiento para la activación de caspasas (CARD) durante la muerte celular, tal como ha sido descrito (Kovasovics *et al.* 2002; Barral *et al.*, 2007). Dicho análisis se llevó a cabo mediante inmunotransferencia de extractos de células SK-Mel-28 y SK-Mel-147 tratadas con PEI, pIC o [pIC]^{PEI}, tras someter dichos extractos a electroforesis. Como control positivo de inducción eficaz de muerte celular se utilizó bortozomib. Los resultados se muestran en la Fig. 5.

Es interesante que la inmunotransferencia de proteínas reveló una capacidad fuerte y sostenida del complejo de PEI y pIC, [pIC]^{PEI}, para inducir el procesamiento de MDA-5 (Fig. 5A). El pIC desnudo fue capaz de inducir este procesamiento, aunque a niveles significativamente menores, y no en todas las células ensayadas (ninguno de los carriles correspondientes a células SK-Mel-28 muestran la banda de 30 kD, característica de la existencia de escisión proteolítica, que debería aparecer a la altura marcada por la flecha en los paneles A y B de la Fig. 5) ni de manera sostenida (véase la Fig. 5A, donde la intensidad de la banda de 30 kD disminuye con el tiempo de tratamiento con pIC en el caso de las células SK-Mel-147).

Para definir la contribución de MDA-5 a la actividad citotóxica de [pIC]^{PEI}, se transdujeron células de melanoma, por medio de vectores lentivirales, con RNAs cortos en horquilla (shRNA) complementarios a MDA-5 para provocar la inactivación estable de MDA-5 (véanse las inmunotransferencias de proteínas en la Fig. 3B). El shRNA dirigido contra MDA-5 redujo significativamente la muerte de células de melanoma provocada por [pIC]^{PEI} sin efectos inespecíficos detectables sobre las células control (Fig 3C, $p < 0,05$).

Es importante que la inducción y el procesamiento de MDA-5 no fue simplemente una consecuencia de la activación de la maquinaria de muerte celular en las células de melanoma. El tratamiento con bortezomib, un inhibidor de proteasomas capaz de activar en melanoma tanto la ruta apoptótica intrínseca como la ligada a receptores relacionados con la muerte celular, no tuvo ningún efecto en los niveles de MDA-5 o en su procesamiento (Fig. 5A). Estos resultados ilustran la existencia de diferencias importantes en el mecanismo de ejecución de los programas de muerte celular por parte de [pIC]^{PEI} y otros inductores proapoptóticos.

- Ejemplo 4

Los inhibidores farmacológicos de la autofagia comprometen la actividad citotóxica de [pIC]^{PEI}

A continuación, los ensayos se centraron en los mecanismos implicados en la ejecución de la muerte celular inducida por [pIC]^{PEI}. La 3-metiladenina (3-MA) y la cloroquina (Chlor) se utilizan frecuentemente para la validación independiente de los mecanismos de autofagia, por su capacidad para interferir con la formación de autofagosomas o la actividad autolisosomal, respectivamente (Maiuri *et al.*, 2007; Klionsky *et al.*, 2008).

Para comprobar si esta interferencia sucedía en células de melanoma tratadas con [pIC]^{PEI}, se sometieron al tratamiento con 3-metiladenina o cloroquina células de melanoma SK-Mel-103 12 horas después del tratamiento con [pIC]^{PEI} o con el tampón control (vehículo). Los resultados se muestran en la Fig. 6.

Tal como se demostró mediante microscopía de fluorescencia, mediante la cual se cuantificaron los focos GFP-LC3 formados (Fig. 6A), 3-MA bloqueó la formación de focos de GFP-LC3 mediada por [pIC]^{PEI}. En presencia de cloroquina, en cambio, se acumularon autofagosomas, pero resulta interesante que esta inducción no resultó productiva como inductora de muerte celular (Fig. 6C, donde se observa que el porcentaje de células muertas observado en presencia de cloroquina es inferior al observado con pepstatina A, E64d o la combinación de ambos). Por ello, estos resultados apoyan la existencia de un escenario en el que la actividad citotóxica de [pIC]^{PEI} no es un subproducto pasivo

de la formación de autofagosomas: la actividad lítica del lisosoma es un mediador esencial en el desencadenamiento de la muerte de células de melanoma por [pIC]^{PEI}.

- Ejemplo 5

[pIC]^{PEI} provoca la fusión de autofagosomas/lisosomas para posteriormente provocar el desencadenamiento de programas de muerte celular

Si el autolisosoma es una pieza clave en la actividad de [pIC]^{PEI}, el bloqueo de las hidrolasas lisosomales debería proteger a las células de melanoma durante el tratamiento con [pIC]^{PEI}. No es factible bloquear toda la actividad dependiente de lisosomas, puesto que en este orgánulo se pueden localizar múltiples enzimas con dianas solapantes (Fehrenbacher and Jaattella, 2005). Aún así, los inhibidores de proteasas de amplio espectro E64d y pepstatina A pueden aportar información útil sobre la actividad lisosomal, pues estos compuestos bloquean de forma eficiente diversas catepsinas (B, D, y L) de los autolisosomas (Klionsky *et al.*, 2008). Por ello, se realizó un ensayo en el que se comparó el efecto de cloroquina, pepstatina A o E64d sobre la muerte celular 20 horas después del tratamiento con el tampón control o con [pIC]^{PEI}. Los resultados se muestran en la Fig. 6C, a la que se ha aludido previamente. Es notable que la pepstatina A y el E64d redujeron en un 50% el grado de muerte celular provocada por [pIC]^{PEI}.

Para confirmar que las vesículas previamente identificadas correspondían a eventos de multifusión en los que estaban implicados endosomas grandes, que su vez reclutan múltiples autofagosomas (para generar las estructuras híbridas conocidas como anfisomas) y que no eran el producto de autofagosomas parados en su evolución, en los que los lisosomas no eran funcionales o no habían sido reclutados, creciendo los autofagosomas como consecuencia de acumulación de material degradado de forma inadecuada, las células de melanoma se transdujeron con fusiones de Cherry-GFP y LC3. Cherry-GFP-LC3 da lugar a señales de fluorescencia rojas y verdes en los autofagosomas, debidas a las dos proteínas fluorescentes presentes (Cherry y GFP), pero pierden la señal debida a GFP (verde) en el ambiente ácido de los autolisosomas. Utilizando esta estrategia se encontró que, de hecho, [pIC]^{PEI}, de forma similar a la rapamicina, puede inducir la formación de autolisosomas en células de melanoma, como indican la presencia de focos LC3, únicamente de color rojo, en la Fig. 6C. La cloroquina, en consonancia con los ensayos previos, bloqueó la muerte de células de melanoma desencadenada por [pIC]^{PEI} (Fig. 6D), sin afectar a la incorporación de endosomas (tal como se determinó visualizando complejos [pIC]^{PEI} marcados con FluoRed, que aparecían colocalizados con las fusiones de GFP con la proteína temprana de los endosomas Rab5 (Fig. 6E). Un efecto inhibitorio similar se encontró con la bafilomicina, un bloqueante de las ATPasas de las vacuolas (Fig. 6D), apoyando de nuevo un modo de acción de [pIC]^{PEI} dependiente de lisosomas.

Para determinar de forma independiente la actividad lisosomal durante el tratamiento con [pIC]^{PEI}, se ensayó la capacidad de las células para procesar DQ-BSA (un derivado de la albúmina de suero bovino, BSA, cuya fluorescencia verde se extingue a menos que la molécula sea escindida mediante enzimas proteolíticas. Tal como se muestra en la Fig. 6F, DQ-BSA resultó escindida de forma eficiente en presencia de [pIC]^{PEI}, donde es significativo notar que la emisión de DQ-BSA se detectó en los lisosomas, como indica la colocalización con Lysotracker-Red (LTR-Red en la Figura, un colorante cuya permeabilidad celular es dependiente del pH y que emite fluorescencia roja cuando se incorpora en lisosomas funcionales ácidos). El resultado contrasta con la emisión mínima de fluorescencia debida a DQ-BSA observada en las células SK-Mel-103 tratadas con [pIC]^{PEI} cuando la actividad lisosomal se bloqueó con cloroquina (Fig. 6F y Fig. 6G).

Para caracterizar más detalladamente la capacidad de [pIC]^{PEI} de provocar la iniciación y desarrollo completo de procesos de autofagia, se realizaron ensayos adicionales de visualización de la fusión de autofagosomas y lisosomas mediante microscopía confocal. Con este objetivo, se trataron con [pIC]^{PEI} o los correspondientes tampones como control, células SK-Mel-103 que expresaban de forma estable GFP-LC3, y se incubaron en presencia de Lysotracker-Red. El análisis de la emisión dual de fluorescencia verde y roja (correspondientes a la fusión GFP-LC3 y Lysotracker-Red, respectivamente), basado en las células individuales y en la población de células, mostró una colocalización clara de autofagosomas y lisosomas (véanse las microfotografías representativas de la fluorescencia en las Fig. 6H y 6I y las correspondientes cuantificaciones en la Fig. 6J). Es importante que esta colocalización fue un evento temprano en las respuestas desencadenadas por [pIC]^{PEI} (es decir, que ya era detectable dentro de las 4 - 8h tras el tratamiento), y precedió a un colapso celular organizado.

Una vez determinado que los autofagosomas se fusionan con lisosomas activos en respuesta [pIC]^{PEI}, se comprobó si estos orgánulos interactuaban con los endosomas o eran "reclutados" por ellos. En primer lugar, se comprobó la dinámica de los endosomas transduciendo células de melanoma con un derivado del marcador tardío de endosomas Rab7 (Luzio *et al.*, 2007), unido a GFP. En las células de melanoma sin tratar (columna izquierda del panel A de la Fig. 7), la generación basal de endosomas y su resolución (es decir, la reducción progresiva de su tamaño); sin embargo, [pIC]^{PEI} exacerbó de forma llamativa la actividad de los endosomas, induciendo una generación sostenida, en varias olas, de endosomas (columnas intermedia y derecha del panel A de la Fig. 7). La detección de imágenes dobles de señal verde y roja debidas, respectivamente, a GFP-Rab7 y Lysotracker-Red mostró que estos endosomas estaban llenos de lisosomas (Fig. 7B). Es más, la microscopía de imágenes tomadas a intervalos de tiempo permitió la visualización de una rápida cinética de múltiples reclutamientos de lisosomas a los endosomas decorados con GFP-Rab7, como puede comprobarse también en las series secuenciales de eventos de fusión mostradas en la Fig. 7C. Es importante señalar que, tal como se muestra en la Fig. 7B (parte derecha), la fusión de endosomas y lisosomas resultó inhibida de forma significativa si las células sobreexpresaban Rab7-T22N, un conocido mutante negativo dominante de esta proteína.

Así, estos resultados revelan una movilización genéticamente programada de los compartimentos endo/lisosomales en células tumorales mediada por [pIC]^{PEI}.

Para determinar si los autofagosomas eran reclutados a formar parte de los endosomas, y en qué momento sucedía esto, se obtuvieron imágenes simultáneas de la fluorescencia debida a GFP-Rab7, Cherry-LC3 y Lysotracker-Blue en diferentes momentos tras la adición de [pIC]^{PEI}. Tal como se muestra en la Fig. 7D, Rab7 se incorporó en la membrana de vesículas “vacías” (endosomas tempranos) preexistentes, que posteriormente reclutaron la presencia de LC3. Es interesante que LC3 parece ser internalizado tras decorar las vesículas positivas para Rab7 completas (comenzando habitualmente con un evento inicial de nucleación: véase la Fig. 7D). La incorporación de LTR-Blue en estos híbridos endosoma-autofagosoma (anfisosomas) fue la última en suceder. En este punto, la vesícula correspondiente disminuyó progresivamente de tamaño hasta volverse indetectable, lo que es indicativo de un proceso degradativo genuino (Fig. 7D: obsérvense las flechas que indican la secuencia de aparición de Rab7>LC3>Lysotracker-Blue). En ausencia de Lysotracker-Blue se encontró un proceso similar de reclutamiento progresivo e internalización de LC3 dentro de los endosomas Rab7 (Fig. 7E), lo que descarta posibles efectos de este agente lisosomotrópico sobre la dinámica de los lisosomas.

En conjunto, estos resultados son consistentes con una autofagia genuina activamente implicada en la ejecución de un programa de muerte controlada.

- Ejemplo 6

[pIC]^{PEI} conecta la autofagia con las caspasas apoptóticas

Las proteasas lisosomales pueden tener un impacto sobre los programas de muerte celular a múltiples niveles (Maiuri *et al.*, 2007; Hoyer-Hansen and Jaattella, 2008). En el caso de las mitocondrias, pueden desregular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o provocar el concurso de caspasas apoptóticas clásicas (la caspasa reguladora casp-9 y las caspasas efectoras casp-3 y casp-7). También pueden responder a la activación lisosomal rutas extrínsecas dependientes de la casp-8 (Fehrenbacher and Jaattella, 2005).

Para abordar la cuestión de la implicación de ROS en el modo de acción de [pIC]^{PEI}, el tratamiento con este complejo se llevó a cabo en presencia de vitamina E, Trolox o Tirón, agentes químicos neutralizantes con diferente actividad antioxidante, así como con el inhibidor pancaspásico z-VAD-fmk. Los resultados al analizar el resultado sobre la muerte celular en cada uno de estos casos se muestran en la Fig. 8A, en la que se han representado los datos obtenidos con la vitamina E como caso representativo de los resultados obtenidos con los agentes químicos antioxidantes mencionados a las dosis de estos reactivos que bloquean en melanoma la apoptosis controlada por ROS (Fernández, 2006). Como puede observarse en dicha figura, la presencia de agentes antioxidantes no dio lugar a efectos significativos sobre la muerte celular provocada por [pIC]^{PEI}. En cambio, el inhibidor general de caspasas z-VAD-fmk inhibió la muerte inducida por [pIC]^{PEI} en un 70%. En conjunto, estos resultados apoyan un mecanismo dependiente de caspasas activado en una etapa posterior de un programa de autofagia.

De hecho, el procesamiento de caspasas fue promovido de forma eficaz por [pIC]^{PEI} según se determinó mediante inmunotransferencia de extractos de células recogidas transcurridos distintos tiempos tras ser sometidas a ningún tratamiento (NT) salvo el tampón control sin PEI o a tratamiento con PEI, pIC, el complejo [pIC]^{PEI} o el conocido inductor de la escisión de caspasas bortezomib (Fig. 8B y Fig. 8C). La Fig. 8B permite comparar la capacidad de PEI, pIC y [pIC]^{PEI} para inducir el procesamiento de las caspasas apoptóticas 8 y 9 en diferentes líneas de melanoma metastásico: una activación efectiva de las caspasas 9 y 8 era claramente evidente 20h después del tratamiento con [pIC]^{PEI} en todas las líneas celulares de melanoma humano ensayadas, de forma análoga a lo que se observó con bortezomib. Es más, la cinética y el grado de procesamiento de las caspasas provocado por [pIC]^{PEI} eran altamente consistentes (Fig. 8B), independientemente de la posible presencia de mutaciones en BRAF (p.ej. SK-Mel-19), NRAS (SK-Mel-103, SK-Mel-147), o p53 (SK-Mel-28).

En la Fig. 8C se muestran los resultados de un ensayo análogo, realizado con la línea SK-Mel-103, donde se realizó un análisis más completo incluyendo, además de las caspasas apoptóticas 9 y 8, las caspasas efectoras 7 y 3; también se realizó el mismo ensayo con la línea SK-Mel-147, que dio lugar a resultados similares. El procesamiento eficaz de las caspasas 9, 3 y 7 en SK-Mel-103 y SK-Mel-147 fue particularmente relevante. Estas líneas tienen bajos niveles de Apaf-1 y son muy ineficaces reclutando el concurso del apoptosoma casp-9/Apaf-1 (Fernández *et al.*, 2005; Soengas *et al.*, 2006) en respuesta a agentes anticancerígenos clásicos tales como doxorrubicina, etopósido o cisplatino (véase el gráfico de la Fig. 1C). Así, estos resultados demuestran una capacidad superior de [pIC]^{PEI} para activar programas apoptóticos y eludir mecanismos de resistencia a fármacos quimioterapéuticos normales.

- Ejemplo 7

Activación de muerte celular por [pIC]^{PEI} en ausencia de efectos compensatorios sobre los miembros de la familia de antiapoptóticos Bcl-2

Para analizar con más detalle el modo de acción de [pIC]^{PEI}, y para identificar eventos que pueden ser activados únicamente por este agente, se comparó la respuesta al fármaco con los efectos de bortezomib. De manera análoga a como se hizo en el Ejemplo anterior, este agente se seleccionó porque es también un potente activador de la maquinaria apoptótica de las células de melanoma (Volter *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2006).

Sin embargo, se esperaba que el bortezomib y $[pIC]^{PEI}$ fueran distinguibles desde el punto de vista del mecanismo. El bortezomib tiene como diana el proteasoma y no el lisosoma (Qin *et al.*, 2005). Es más, como se muestra en la Fig. 5A, el bortezomib mata las células de melanoma sin inducir o procesar MDA-5. El bortezomib también es interesante porque puede promover una acumulación masiva del proapoptótico NOXA, pero también inducir una regulación al alza, rápida y drástica, de su factor antagonista antiapoptótico MCL-1 (37, 49), un miembro de la familia de Bcl-2. Es importante que MCL-1 actúa como un mecanismo interno de compensación a la inhibición del proteasoma y bloquea el efecto antitumorigénico de Bortezomib *in vitro* e *in vivo* (Wolter *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2006).

Para evaluar las similitudes y diferencias entre bortezomib y pIC (desnudo o acompañado con PEI), las células de melanoma se incubaron con cada uno de estos compuestos y se recogieron extractos en diferentes momentos después del tratamiento para evaluar los niveles de NOXA, MCL-1, y otros miembros de la familia de Bcl-2 (Bcl-xL y el propio Bcl-2). Los resultados se muestran en la Fig. 9.

Tal como puede verse en los paneles A y B de la Fig. 9, el pIC desnudo no fue capaz de inducir NOXA de manera consistente o sostenida en células de melanoma SK-Mel-28 o SK-Mel-147 (células que expresan, respectivamente, p53 con la mutación L145R o p53 tipo silvestre). Por otra parte, $[pIC]^{PEI}$ indujo NOXA 35, 10 y 5 veces respecto a los niveles basales en SK-Mel-28, SK-Mel-147 y SK-Mel-103, respectivamente (véanse las inmunotransferencias de los paneles A y C de la Fig. 9, y las cuantificaciones representativas de la Fig. 9B, correspondientes a los datos obtenidos en células SK-Mel-28), enfatizando de nuevo la actividad diferencial entre el pIC desnudo y el pIC acompañado con PEI.

Con respecto a los reguladores inhibitorios de NOXA, los niveles de MCL-1 resultaron mínimamente inducidos por $[pIC]^{PEI}$ (Fig. 9A y primer gráfico de la Fig. 9B). Esto contrasta con el bortezomib, que activa NOXA de forma potente, pero induce una acumulación simultánea de MCL-1, tal como se ha descrito previamente (Fernández *et al.*, 2005). Otros miembros de la familia de anti-apoptóticos Bcl-2 tales como Bcl-2 y Bcl-xL tampoco se vieron afectados por $[pIC]^{PEI}$ (véanse las inmunotransferencias de SK-Mel-103 en la Fig. 9C).

En ausencia de mecanismos compensatorios, los niveles relativamente más bajos de NOXA inducidos por $[pIC]^{PEI}$ podrían ser suficientes para promover la muerte celular. Para comprobar esta hipótesis, se infectaron células de melanoma SK-Mel-103 con un vector lentiviral que expresaba un shRNA que previamente se había demostrado que inhibía específicamente el mRNA y la proteína de NOXA (Fernández *et al.*, 2005), realizando paralelamente un ensayo control en el que las células se infectaron con un vector lentiviral que expresaba un shRNA control inactivo. Como se muestra en la Fig. 9D, una reducción del 50% en la expresión de la proteína NOXA por el shRNA dirigido contra ella inhibió la regulación al alza de NOXA por parte de $[pIC]^{PEI}$ también aproximadamente en un 50%, e inhibió la toxicidad de $[pIC]^{PEI}$, reduciendo el porcentaje de muerte celular observada (Fig. 9E).

A continuación, se utilizó un shRNA dirigidos contra MDA-5 para definir los requerimientos de esta proteína para la regulación de NOXA mediante $[pIC]^{PEI}$ y se realizó un ensayo análogo al realizado con el shRNA dirigido contra NOXA, aunque el parámetro evaluado en esta ocasión fueron los niveles de NOXA. Los resultados se representan el gráfico de la Fig. 9F. Es interesante que el shRNA de MDA-5 inhibió los niveles en la proteína NOXA en un 70% (Fig. 9F), sin efectos secundarios sobre otros miembros de la familia de Bcl-2.

En conjunto, estos resultados desvelan un nuevo punto de acción de MDA-5 en la maquinaria apoptótica controlada por la inducción de NOXA.

- Ejemplo 8

Inhibición de la diseminación del melanoma metastásico mediante $[pIC]^{PEI}$ en ratones inmunocompetentes

A continuación, se evaluó la actividad anti-melanoma de pIC y $[pIC]^{PEI}$ *in vivo*. En modelos de melanoma, el pIC desnudo tiene que ser administrado o a dosis elevadas o en combinación con otros agentes (p.ej. inhibidores de la síntesis de proteínas) para conseguir una activación eficaz de los programas de inmunidad innatos. Los datos obtenidos en los ensayos de los Ejemplos anteriores indicaban que pIC sería significativamente más potente en presencia de PEI.

La respuesta al tratamiento se analizó en primer lugar en un contexto inmunocompetente. Las células de melanoma de ratón B16, bien sin transducir o transducidas con GFP (para facilitar la detección mediante obtención de imágenes de fluorescencia), se implantaron en ratones normales singénicos C57BL/6. Se utilizaron dos estrategias: inyección de células tumorales (i) por vía subcutánea (s.c.) o (ii) intravenosa (i.v.), para evaluar la progresión del tumor en lugares localizados o como metástasis distantes, respectivamente. Los ratones se trataron con PEI, pIC, $[pIC]^{PEI}$ o 100 μ l de glucosa al 5% (grupo NT: ningún tratamiento).

El esquema de las Fig. 10A resume la estrategia experimental seguida, para la generación de xenoinjertos subcutáneos de células B16, junto con los tiempos de tratamiento en inyecciones peritumorales de 2 ng/kg de pIC desnudo o acompañado con PEI. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Es notable que, en todos los casos estudiados, se encontró que $[pIC]^{PEI}$ era superior a pIC. Así, los ratones con melanomas B16 creciendo subcutáneamente que recibieron el vehículo, PEI o pIC solo, tuvieron que ser sacrificados a los 15-25 días después del implante, debido a un crecimiento excesivo de los tumores (Fig. 10A). En las mismas

condiciones, los melanomas subcutáneos del grupo de tratamiento con [pIC]^{PEI} eran indetectables o significativamente más pequeños (Fig. 10A).

La Fig. 10B resume la estrategia experimental seguida para la implantación intravenosa de células de melanoma B16-eGFP y el tratamiento posterior al implante con pIC, PEI, el complejo [pIC]^{PEI} o simplemente con glucosa al 5% (grupo NT: ningún tratamiento). En la misma se muestran las imágenes de fluorescencia obtenidas de los pulmones tras el sacrificio de los animales, mientras que los resultados del recuento de metástasis externas se representa en la Fig. 10C. En este ensayo, también se encontró que [pIC]^{PEI} era 5 veces más potente que el pIC desnudo es modelos sustitutorios de metástasis de melanoma en pulmón, tal como se determinó mediante obtención de imágenes de fluorescencia.

- Ejemplo 9

IFN no reproduce los rasgos de inducción de muerte celular de [pIC]^{PEI}

pIC es un inductor clásico de la inmunidad celular controlada por el IFN (Wenzel *et al.*, 2008)). Los datos expuestos en los Ejemplos anteriores sugerían, sin embargo, que pIC, cuando está acompañado con PEI, también podría actuar de manera autónoma en la célula, lo que puede ser distinguible de las respuestas mediadas por el IFN en las células inmunes “profesionales”. Para evaluar esta posibilidad, se ensayó en células de melanoma B16 y macrófagos su capacidad para secretar y responder al IFN- α . La RT-PCR indicó que ambos tipos celulares activaron dianas clásicas del IFN- α tales como IFIT-1 (proteína con repeticiones de tetratricopeptidos inducida por IFN) tras el tratamiento con [pIC]^{PEI} (Fig. 11A). El PEI resultó ser dispensable para la inducción de dianas del IFN mediada por pIC en macrófagos (Fig. 11A). Esto era esperable, pues estas células pueden detectar de forma eficiente el dsRNA viral. Las células de melanoma, sin embargo, fueron incapaces de inducir IFIT-1 solamente con pIC desnudo (Fig. 11A).

Para realizar una evaluación directa de la producción de IFN- α por las células de melanoma, se llevó a cabo un ensayo de Elispot, utilizando IFN- α humano recombinante como control de referencia. Los niveles de IFN- α secretados por las células de melanoma después del tratamiento con [pIC]^{PEI} fueron menores de 10 pg/ml. Para determinar si el IFN- α se puede sustituir por [pIC]^{PEI} (es decir, si la secreción de IFN- α es el inductor principal de la muerte celular en melanomas), se añadieron a células de melanoma cantidades crecientes de esta citoquina. Es interesante que las dosis elevadas de IFN- α (10 veces superiores a los niveles secretados después del tratamiento con [pIC]^{PEI}) fueron incapaces de afectar a la viabilidad de las células de melanoma (Fig 11B).

Es interesante señalar también que los ensayos con microarrays mostraron que a respuesta al pIC, además de ser bastante transitoria, implicaba genes esperables de respuesta a interferón, tal como se muestra en la Fig. 11C). En cambio, el efecto del [pIC]^{PEI}, además de ser sostenido, se extendía a transcritos adicionales.

Por ello, estos resultados ilustran diferencias intrínsecas en el reconocimiento y detección de agentes miméticos de dsRNA en macrófagos y células de melanoma.

- Ejemplo 10

Inhibición del crecimiento metastásico mediante [pIC]^{PEI} en ratones gravemente inmunocomprometidos

Puesto que las células de melanoma son frecuentemente inmunorresistentes, se ensayó si la toxicidad directa de [pIC]^{PEI} dirigida a las células de melanoma seguía siendo eficiente en un contexto altamente inmunodeficiente. El mecanismo efector más frecuentemente asociado con la inmunotolerancia del melanoma son los defectos en la señalización de células NK, T y B (Kirkwood *et al.*, 2008), por lo que se decidió realizar ensayos de muerte celular tumoral en un contexto severamente inmunocomprometido similar al de los melanomas. Por ello, se ensayó la eficacia de pIC (como agente único o acompañado con PEI) para bloquear el crecimiento del melanoma en ratones Beige con inmunodeficiencia severa combinada (SCID), que carecen de linfocitos NK, T y B funcionales.

Para realizar un seguimiento de la eficacia del tratamiento el control de las metástasis pulmonares, las células de melanoma se marcaron con GFP y se inyectaron por vía intravenosa, siguiendo un esquema de tratamiento análogo al descrito en el Ejemplo 8 para la implantación de células de melanoma B16 en ratones inmunocompetentes. Como ejemplos representativos de melanomas de ratón y de seres humanos, se utilizaron, respectivamente, células de melanoma B16 (Fig. 12, paneles A, B y C) y SK-Mel-103 (Fig. 12, paneles D y E).

En ambos modelos celulares, [pIC]^{PEI} fue capaz de inhibir el crecimiento de melanomas en el pulmón. La Fig 12A muestra la llamativa diferencia en el número de metástasis B16 visibles en la superficie del pulmón después del tratamiento con [pIC]^{PEI} (véase la cuantificación en la Fig. 10B). Los análisis histológicos confirmaron también la reducción en el número y el tamaño de los nódulos pulmonares controlados por B16 en el grupo de [pIC]^{PEI} (Fig. 12C).

Análisis similares mostraron un claro efecto antitumoral de [pIC]^{PEI} (pero no del pIC no acompañado) en el control del crecimiento diseminado de SK-Mel-103 (Fig. 12, paneles D y E).

Así, incluso en los ratones beige con SCID, que representan un modelo altamente inmunosuprimido (Croy and Chapeau, 1990), [pIC]^{PEI} fue capaz de controlar la colonización de los pulmones por células B16 o SK-Mel-103, sin que pIC mostrara virtualmente ningún efecto.

5 - Ejemplo 11

Inhibición del crecimiento metastásico mediante [pIC]^{PEI} en modelos animales del melanoma humano

Las diferencias entre pIC y [pIC]^{PEI} se compararon en un tercer sistema, el de los ratones Tyr::NRAS^{Q61K} x INK4a/ARF^{-/-}, que desarrollan melanomas con características similares a las de la enfermedad humana (Ackermann *et al.*, 2005). Para ello, los ratones se trataron tópicamente con una única dosis de DMBA (7,12-dimetilbenz[a]antraceno, adquirido a Sigma) y, al aparecer las lesiones pigmentadas, se trataron con pIC, [pIC]^{PEI} o PEI en glucosa al 5% (grupo control). De nuevo, se observó que la actividad antitumoral de [pIC]^{PEI} era significativamente mayor que la de pIC desnudo, tal como lo indican las medidas directas del tamaño de los tumores (Fig. 13A y 13B), la visualización de la actividad metabólica de los tumores mediante PET-CT (Fig. 13C) y los análisis histológicos (Fig. 13D). Es significativo que [pIC]^{PEI} duplicó el intervalo de tiempo sin lesiones en progresión (Fig. 13A) en los regímenes de dosificación utilizados, sin que se apreciaran signos de toxicidad secundaria (véase el análisis de la Fig. 13 D).

Estos resultados apoyan la viabilidad de los tratamientos basados en la administración de análogos de dsRNA para contrarrestar el comportamiento agresivo de las células de melanoma.

Referencias bibliográficas

- 25 **Ackermann, J., Frutschi, M., Kaloulis, K., McKee, T., Trumpp, A., and Beermann, F. (2005).** Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res* 65, 4005-4011.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. 2006.** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
- 30 **Alonso, S. R., Tracey, L., Ortiz, P., et al. (2007)** A high throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res* 67:3450-3460.
- Barral, P. M., Morrison, J. M., Drahos, J., Gupta, P., Sarkar, D., Fisher, P. B., and Racaniello, Y. R. 2007.** MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells. *J Virol* 81:3677-3684.
- 35 **Celada, A., Gray, P. W., Rinderknecht, E., and Schreiber, R. D. 1984.** Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity. *J Exp Med* 160:55-74.
- 40 **Chin, L., Garraway, L. A., and Fisher, D. E. 2006.** Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev* 20:2149-2182.
- Croy, B. A., and Chapeau, C. 1990.** Evaluation of the pregnancy immunotrophism hypothesis by assessment of the reproductive performance of young adult mice of genotype scid/scid.bg/bg. *J Reprod Fertil* 88:231-239.
- 45 **Denoyelle, C., Abou-Rjaily, G., Bezrookove, V., Verhaegen, M., Johnson, T. M., Fullen, D. R., Pointer, J. N., Gruber, S. B., Su, L. D., Nikiforov, M. A., et al. 2006.** Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 8:1053-1063.
- 50 **Fecher, L. A., Cummings, S. D., Keefe, M. J., and Alani, R. M. 2007.** Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol* 25:1606-1620.
- Fehrenbacher, N., and Jaattela, M. 2005.** Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res* 65:2993-2995.
- 55 **Fernández, Y., Miller, T. P., Denoyelle, C., Esteban, J. A., Tang, W. H., Bengston, A. L., and Soengas, M. S. 2006.** Chemical blockage of the proteasome inhibitory function of bortezomib: impact on tumor cell death. *J Biol Chem* 281:1107-1118.
- 60 **Fernández, Y., Verhaegen, M., Miller, T. P., Rush, J. L., Steiner, P., Opipari, A. W., Jr., Lowe, S. W., and Soengas, M. S. 2005.** Differential regulation of noxa in normal melanocytes and melanoma cells by proteasome inhibition: therapeutic implications. *Cancer Res* 65:6294-6304.
- Field, A. K., Tytell, A. A., Lampson, G. P., and Hilleman, M. R. 1967.** Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58:1004-1010.
- 65 **Flaherty, K. T. 2006.** Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 12:2366s-2370s.

- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., and Marais, R. 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445:851-857.
- Hersey, P., and Zhang, X. D. 2008. Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 21:358-367.
- Hippert, M. M., O'Toole, P. S., and Thorburn, A. 2006. Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res* 66:9349-9351.
- Hoyer-Hansen, M., and Jaattela, M. 2008. Autophagy: an emerging target for cancer therapy. *Autophagy* 4:574-580.
- Ilkovitch, D., and López, D. M. 2008. Immune modulation by melanoma-derived factors. *Exp Dermatol*.
- Ivanov, V. N., Bhoumik A and Ronai Ze'ev. 2003. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene* 22:3152-3161.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., and Thun, M. J. 2008. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 58:71-96.
- Kang, D. C., Gopalkrishnan, R. V., Lin, L., Randolph, A., Valerie, K., Pestka, S., and Fisher, P. B. (2004). Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. *Oncogene* 23, 1789-1800.
- Kang, D. C., Gopalkrishnan, R. V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A.M., and Fisher, P.B. 2002. mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNAdependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:637-642.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O., and Akira, S. 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6:981-988.
- Kirkwood, J. M., Tarhini, A. A., Panelli, M. C., Moschos, S. J., Zarour, H. M., Butterfield, L. H., and Gogas, H. J. 2008. Next generation of immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol* 26:3445-3455.
- Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., Baba, M., Baehrecke, E. H., Bahr, B. A., Ballabio, A., et al. 2008. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4:151-175.
- Kovacsovics, M., Martinon, F., Micheau, O., Bodmer, J. L., Hofmann, K., and Tschopp, J. 2002. Overexpression of Helicard, a CARD-containing helicase cleaved during apoptosis, accelerates DNA degradation. *Curr Biol* 12:838-843.
- Kroemer, G. and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:1004-1010.
- Kroemer, G., Galluzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deity, W. S., Golstein, P., Green, D. R., et al.(2009). Classification of cell death: recommendations for the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16:3-11.
- Lev, D. C., Onn, A., Melinkova, V. O., Miller, C., Stone, V., Ruiz, M., McGary, E. C., Ananthaswamy, H. N., Price, J. E., and Bar-Eli, M. 2004. Exposure of melanoma cells to dacarbazine results in enhanced tumor growth and metastasis *in vivo*. *J Clin Oncol* 22:2092-2100.
- Lin, L., Su, Z., Lebedeva, I. V., Gupta, P., Boukerche, H., Rai, T., Barber, G. N., Dent, P., Sarkar, D., and Fisher, P. B. 2006. Activation of Ras/Raf protects cells from melanoma differentiation-associated gene-5-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 13:1982-1993.
- Luzio, J. P., Pryor, P. R. and Bright, N. A. (2007). Lysosomes: fusión and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 622-632.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. 2007. Self-eating and selfkilling: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:741-752.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., and Klionsky, D. J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451:1069-1075.
- Payne, C. K. 2007. Imaging gene delivery with fluorescence microscopy. *Nanomed* 2:847-860.

Qin, J. Z., Xin, H., Sitailo, L. A., Denning, M. F., and Nickoloff, B. J. 2006. Enhanced killing of melanoma cells by simultaneously targeting Mcl-1 and NOXA. *Cancer Res* 66:9636-9645.

Qin, J. Z., Ziffra, J., Stennett, L., Bodner, B., Bonish, B. K., Chaturvedi, V., Bennett, F., Pollock, P. M., Trent, J. M., Hendrix, M. J., et al. 2005. Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Res* 65:6282-6293.

Robinson, R. A., DeVita, V. T., Levy, H. B., Baron, S., Hubbard, S. P., and Levine, A. S. 1976. A phase I-II trial of multiple-dose polyribonucleoside-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 57:599-602.

Schatton, T., Murphy, G. F., Frank, N. Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L. M., Weishaupt, C., et al. 2008. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451:345-349.

Soengas, M. S., and Lowe, S. W. 2003. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22:3138-3151.

Soengas, M. S., Capodiceci, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J. G., Gerald, W. L., Lazebnik, Y. A., et al. 2001. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409:207-211.

Soengas, M. S., Gerald, W. L., Cordon-Cardo, C., Lazebnik, Y., and Lowe, S. W. 2006. Apaf-1 expression in malignant melanoma. *Cell Death Differ* 13:352-353.

Tawbi, H. A., and Kirkwood, J. M. 2007. Management of metastatic melanoma. *Semin Oncol* 34:532-545.

Tormo, D., Ferrer, A., Bosch, P., Gaffal, E., Basner-Tschakarjan, E., Wenzel, J., and Tuting, T. 2006. Therapeutic efficacy of antigen-specific vaccination and toll-like receptor stimulation against established transplanted and autochthonous melanoma in mice. *Cancer Res* 66:5427-5435.

Verma, S., Petrella, T., Hamm, C., Bak, K., and Charette, M. 2008. Biochemotherapy for the treatment of metastatic malignant melanoma: a clinical practice guideline. *Curr Oncol* 15:85-89.

Wenzel, J., Tormo, D., and Tuting, T. 2008. Toll-like receptor-agonists in the treatment of skin cancer: history, current developments and future prospects. *Handb Exp Pharmacol*:201-220.

Wilcox, R., and Markovic, S. N. 2007. Tumor immunotherapy in melanoma: on the dawn of a new era? *Curr Opin Mol Ther* 9:70-78 .

Wolter, K. G., Verhaegen, M., Fernández, Y., Nikolovska-Coleska, Z., Riblett, M., de la Vega, C. M., Wang, S., and Soengas, M. S. 2007. Therapeutic window for melanoma treatment provided by selective effects of the proteasome on Bcl-2 proteins. *Cell Death Differ* 14:1605-1616.

Xie, Z., and Klionsky, D. J. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9:1102-1109.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Akira, S., et al. 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 175:2851-2858.

REIVINDICACIONES

5 1. Compuesto que comprende una combinación de un fragmento de RNA de doble cadena (dsRNA), o un análogo del mismo, y un portador policationico.

2. Compuesto, según la reivindicación 1, que comprende una combinación de ácido poliinosin-policitidílico (pIC) y polietilenimina (PEI).

10 3. Uso del compuesto de las reivindicaciones 1 ó 2 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del melanoma.

4. Uso, según la reivindicación 3, en el que el tratamiento va destinado al tratamiento de un paciente inmunocomprometido.

15 5. Medicamento destinado al tratamiento del melanoma que comprende el compuesto de las reivindicaciones 1 ó 2.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

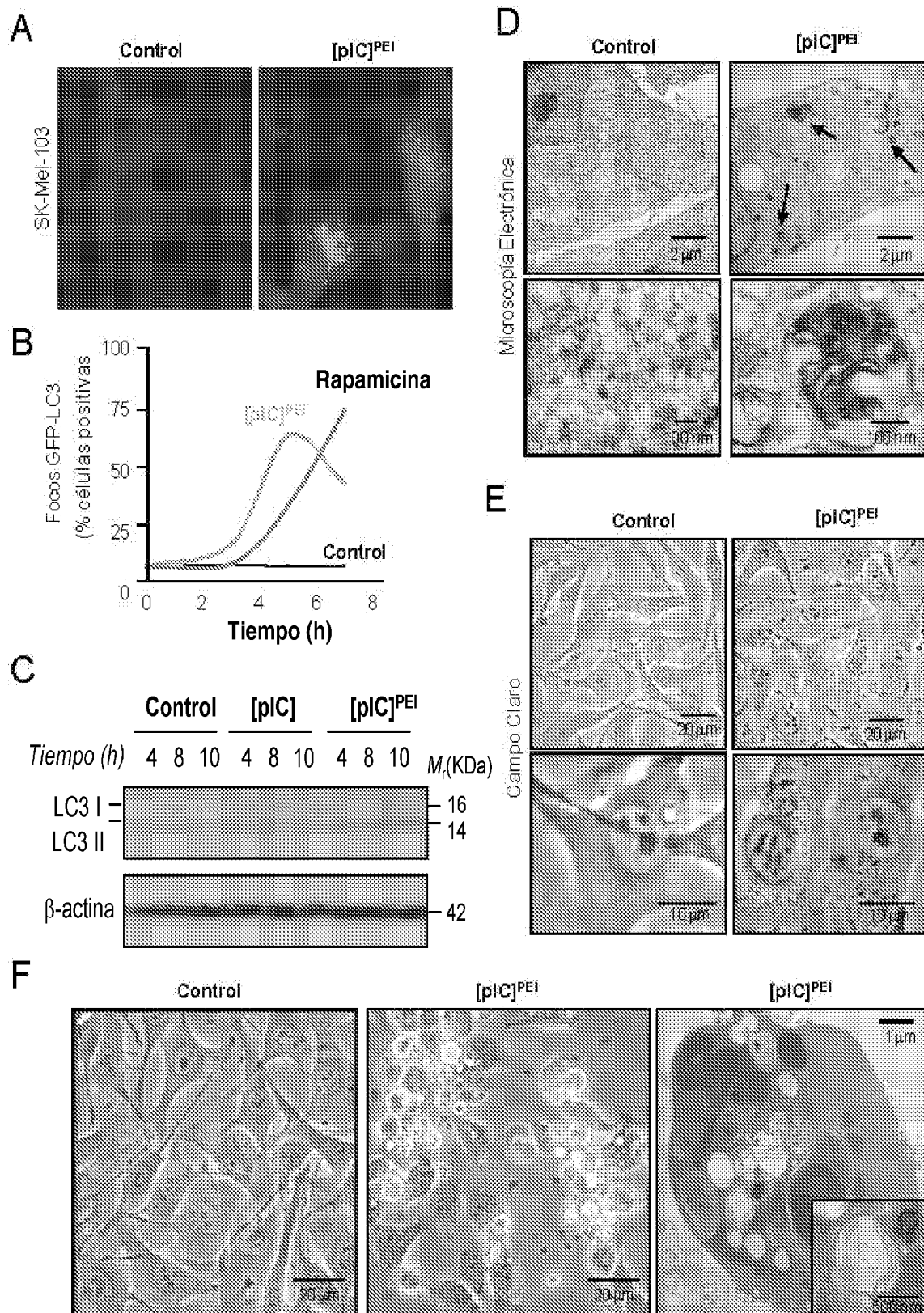
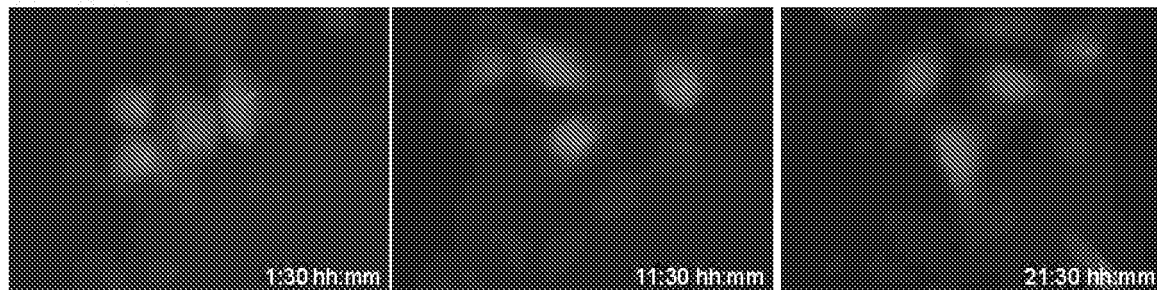


Fig. 1

Control



[pIC]^{PEI}

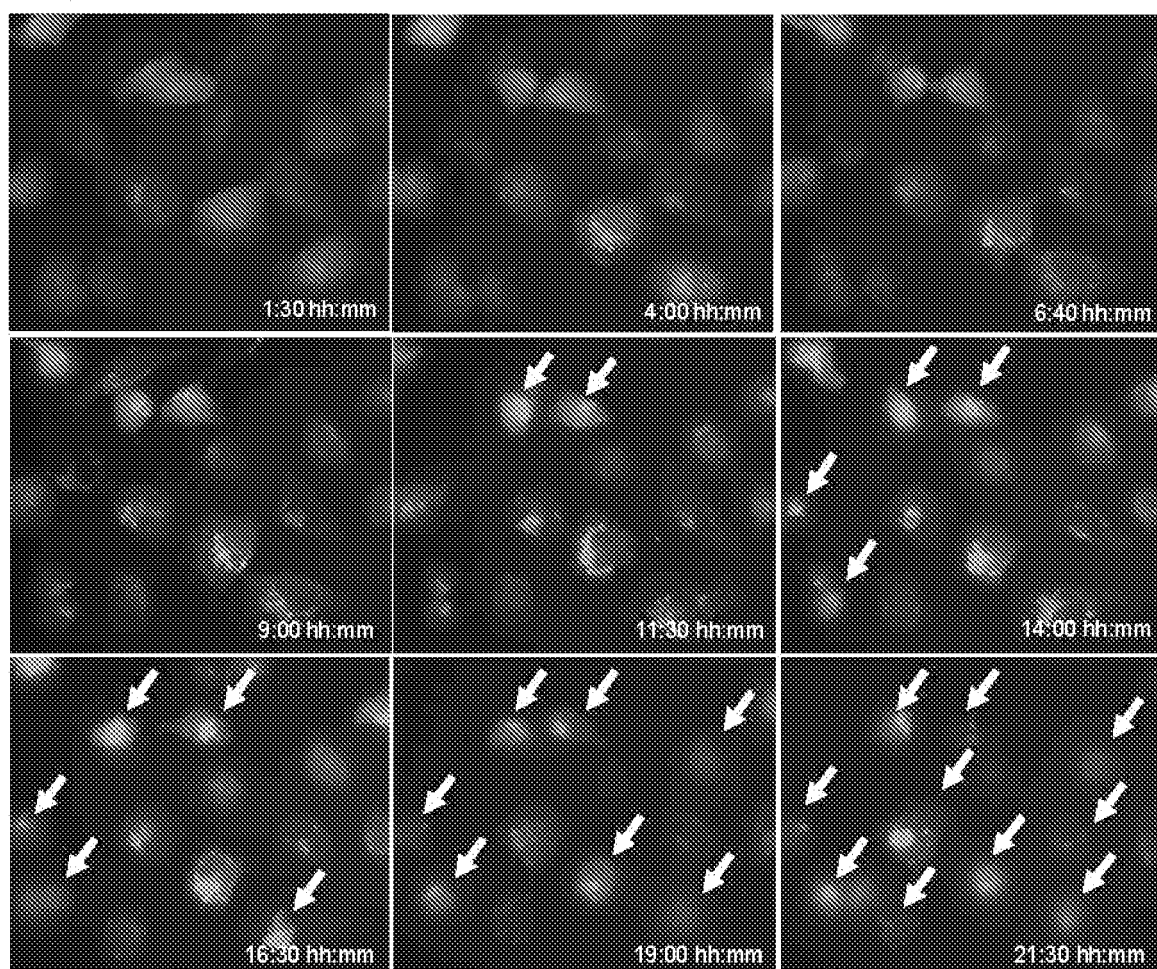


Fig. 2

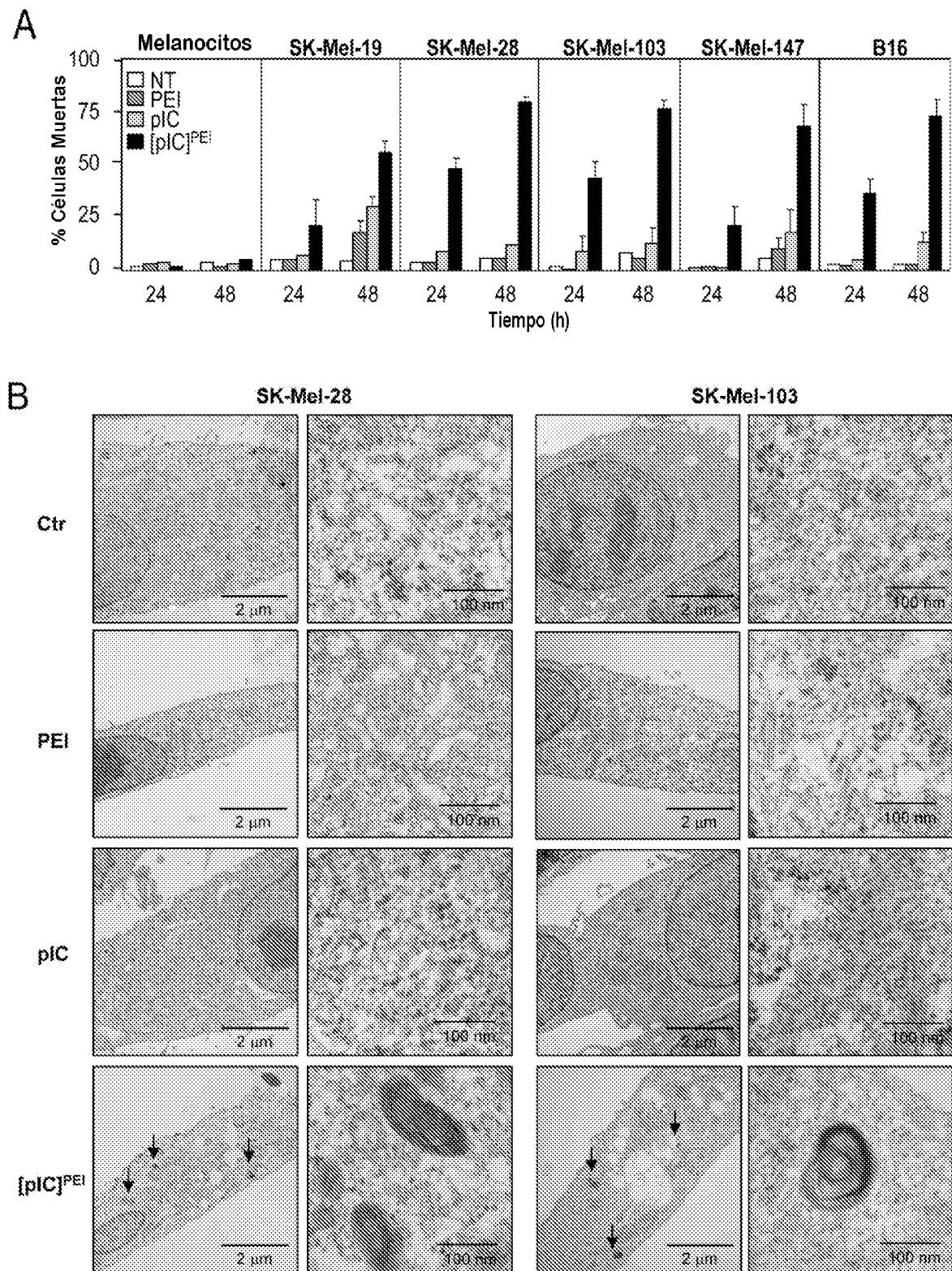
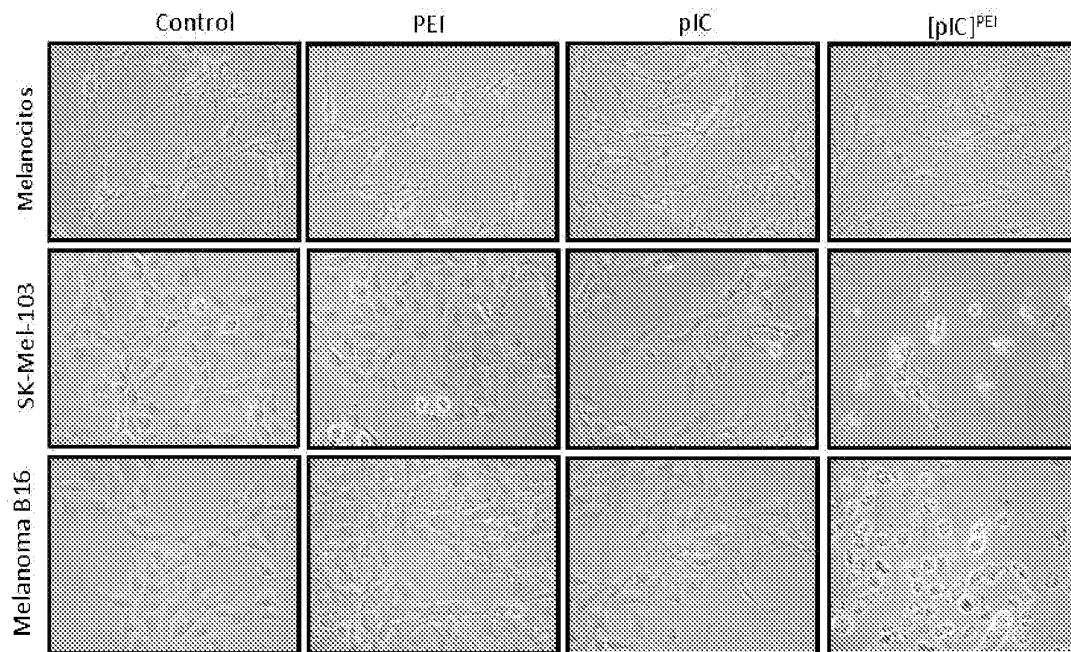
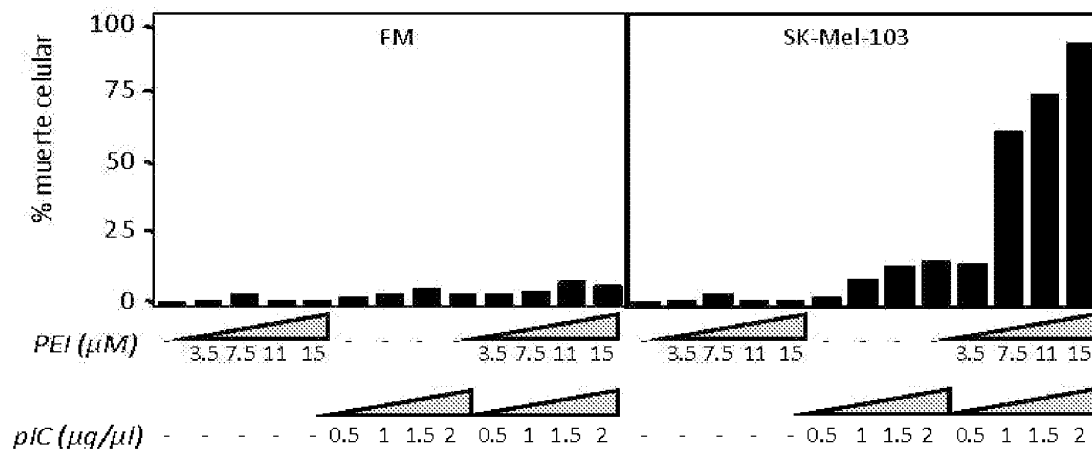


Fig. 3

A



B



C

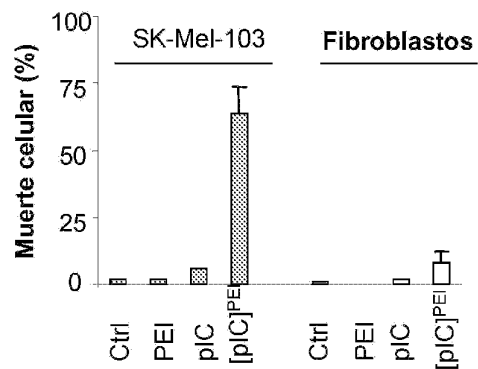


Fig. 4

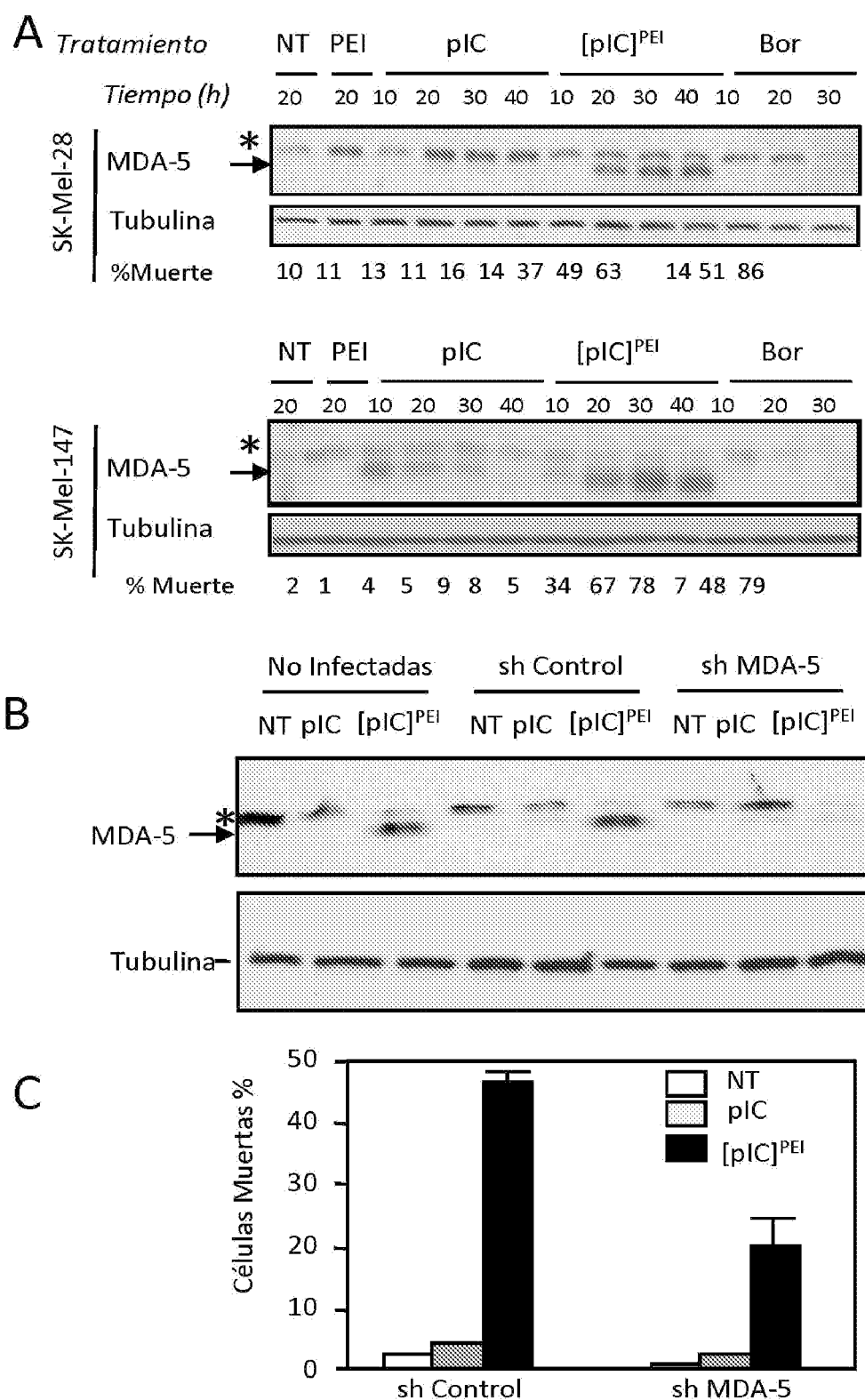


Fig. 5

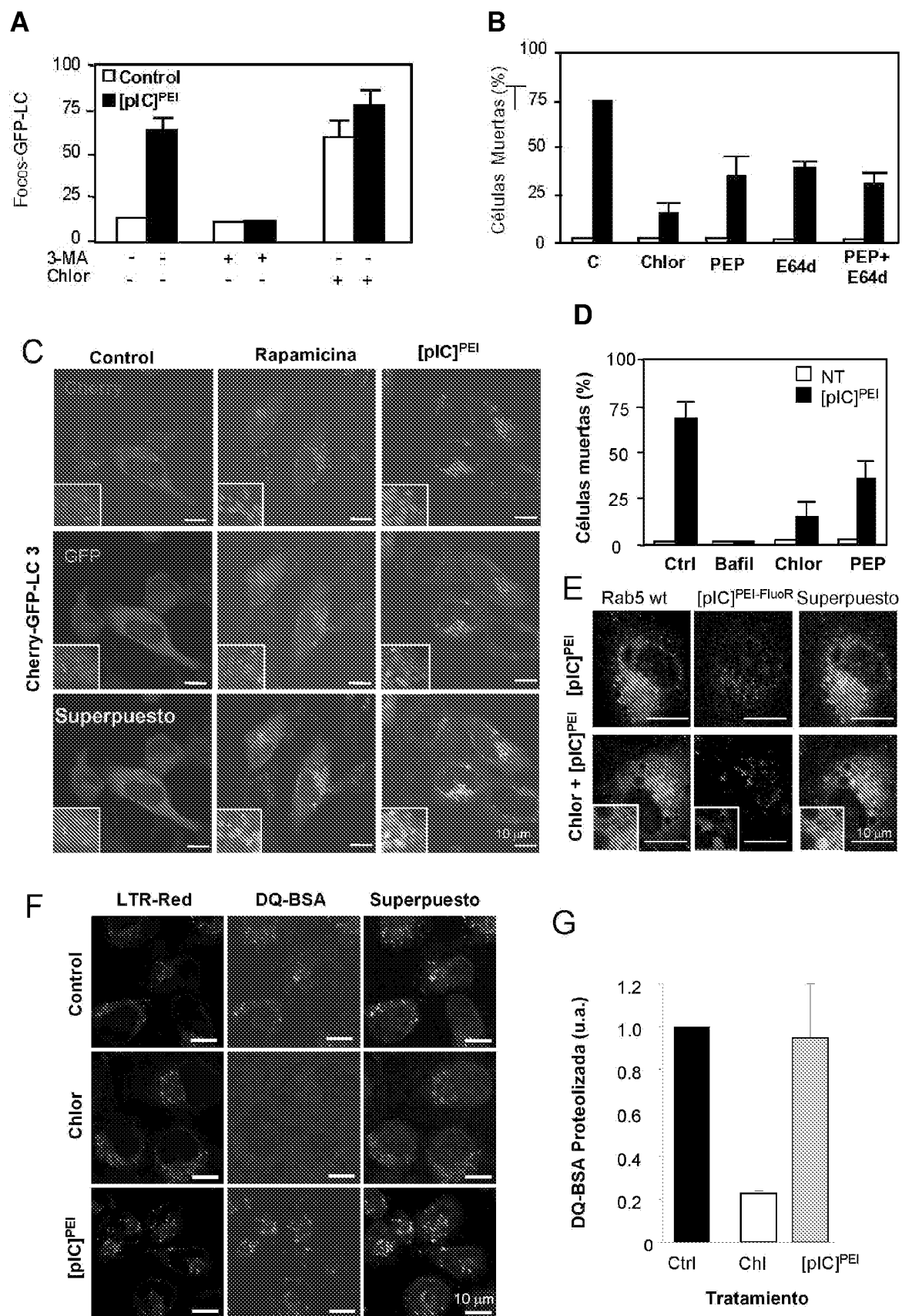
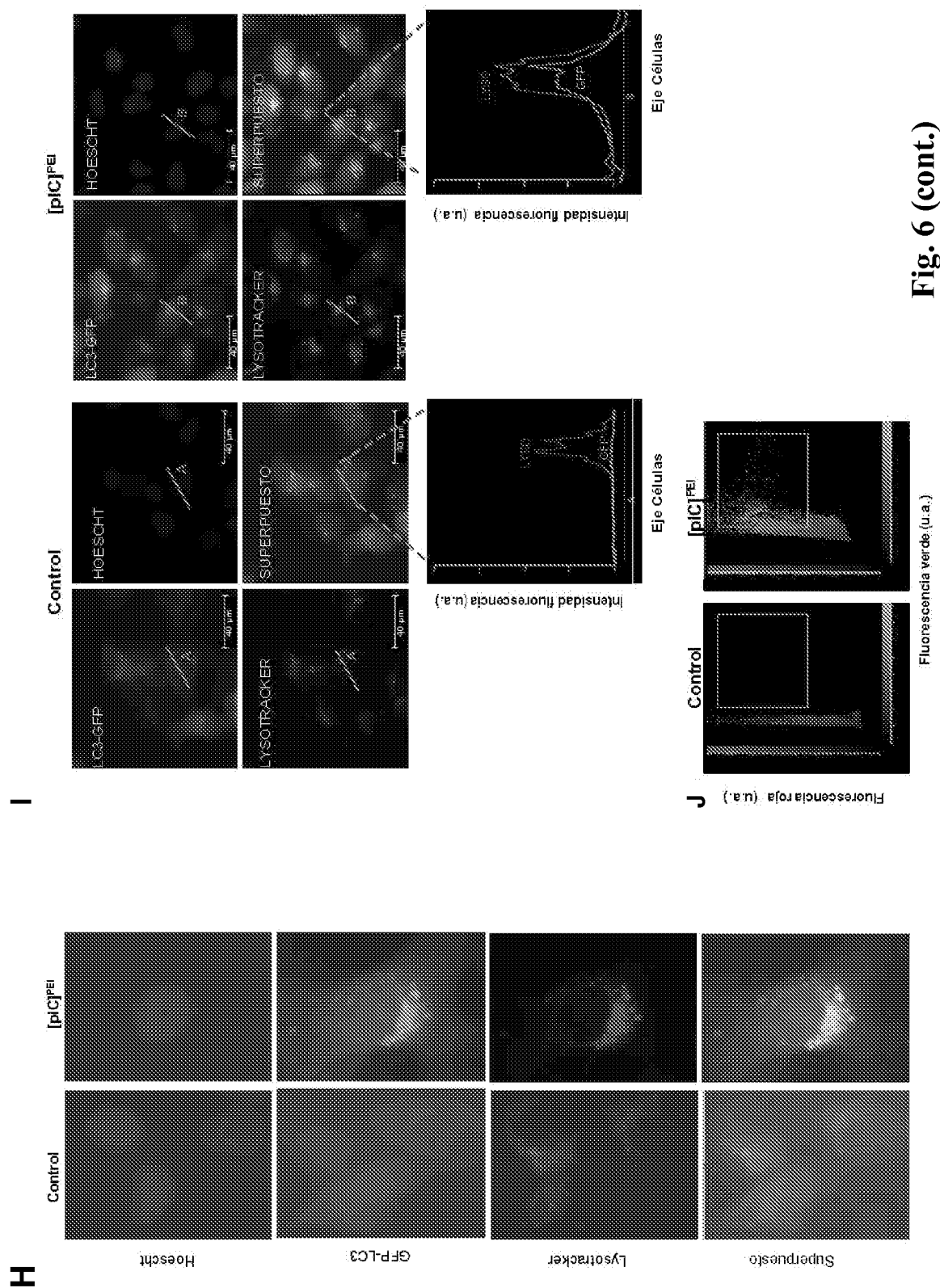


Fig. 6



A

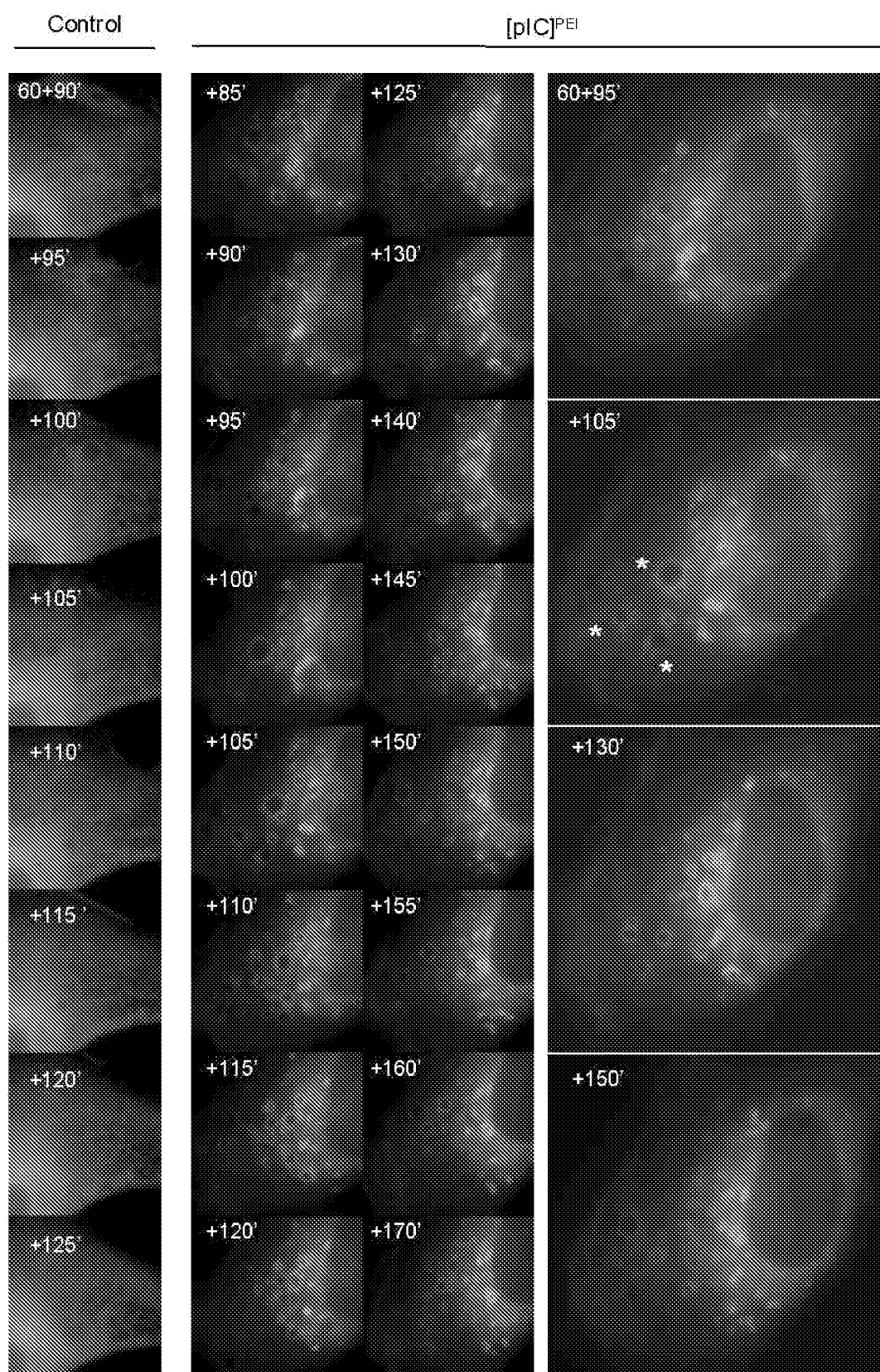


Fig. 7

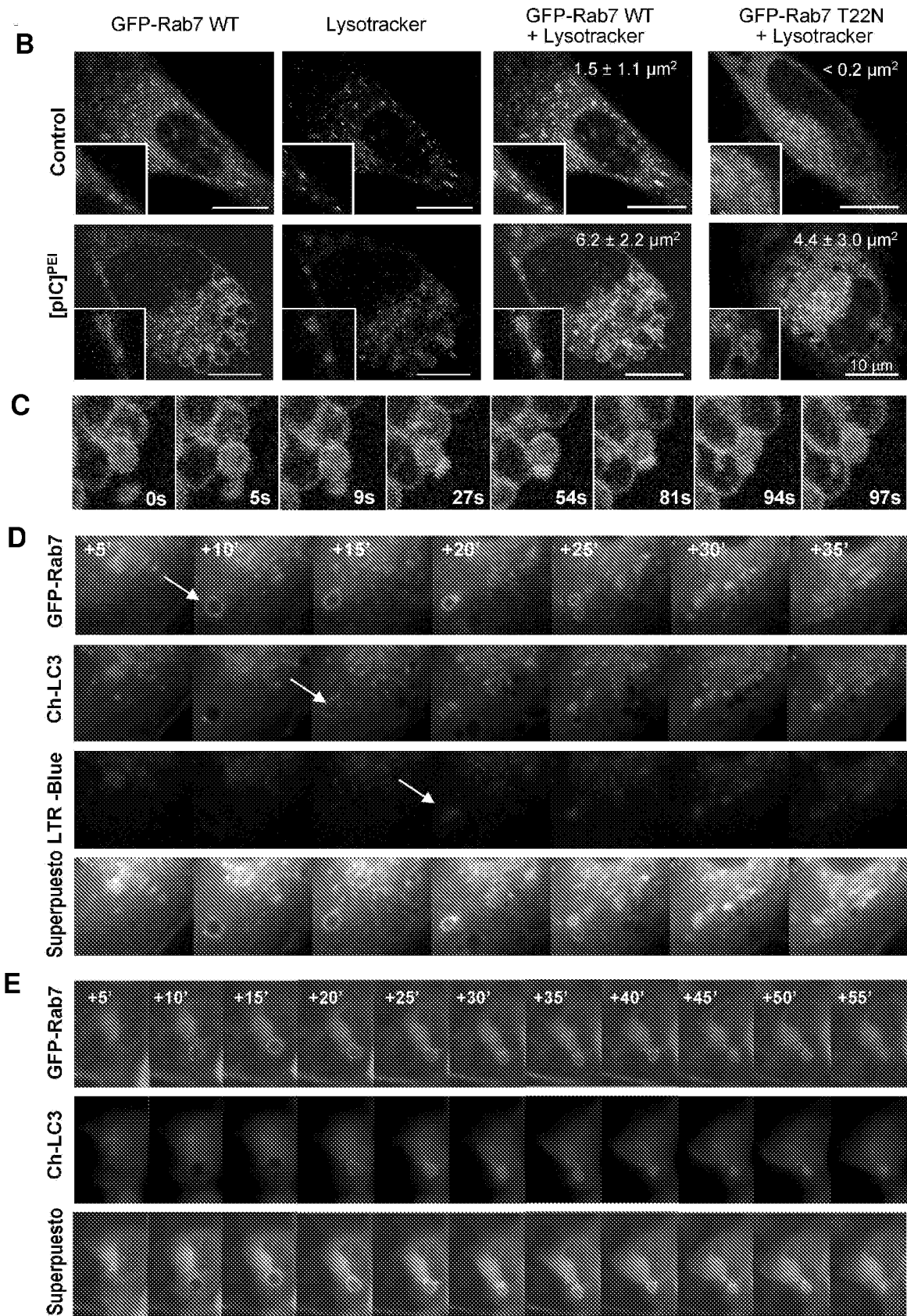
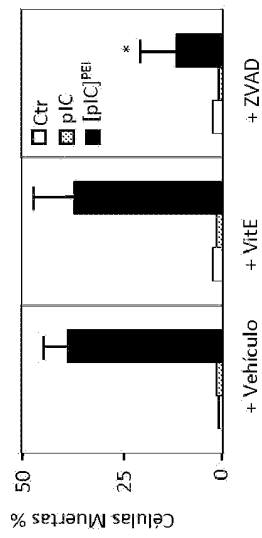
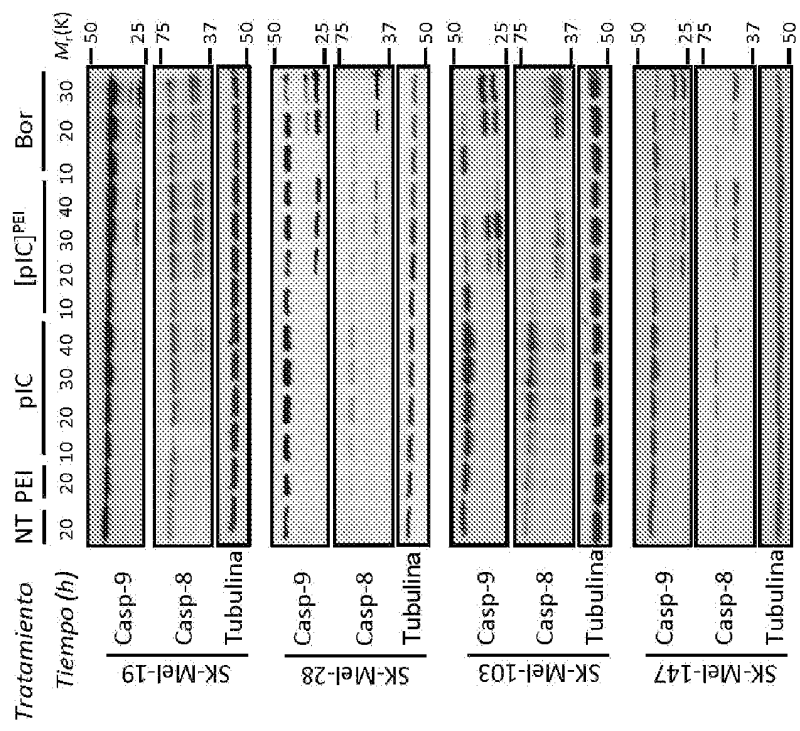


Fig. 7 (cont.)

A



B



C

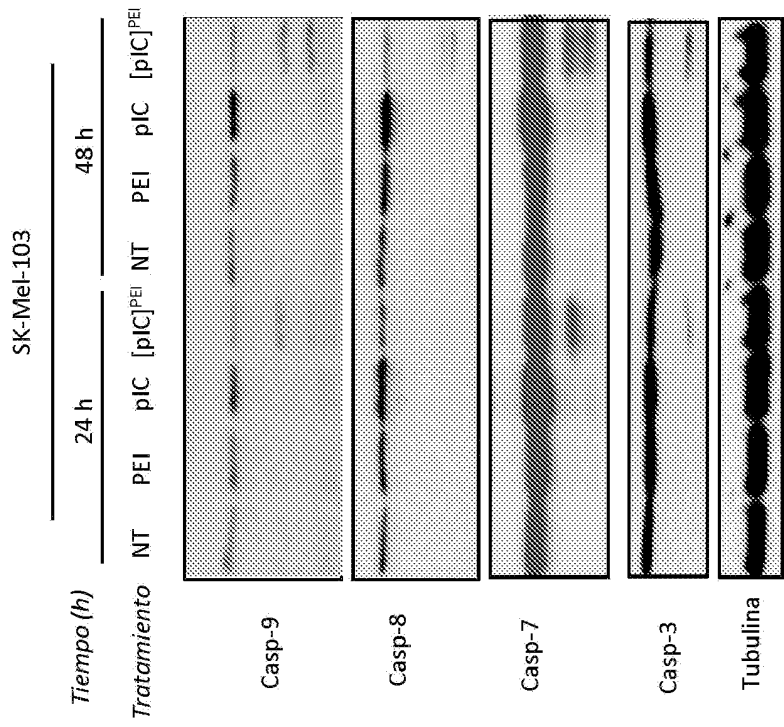


Fig. 8

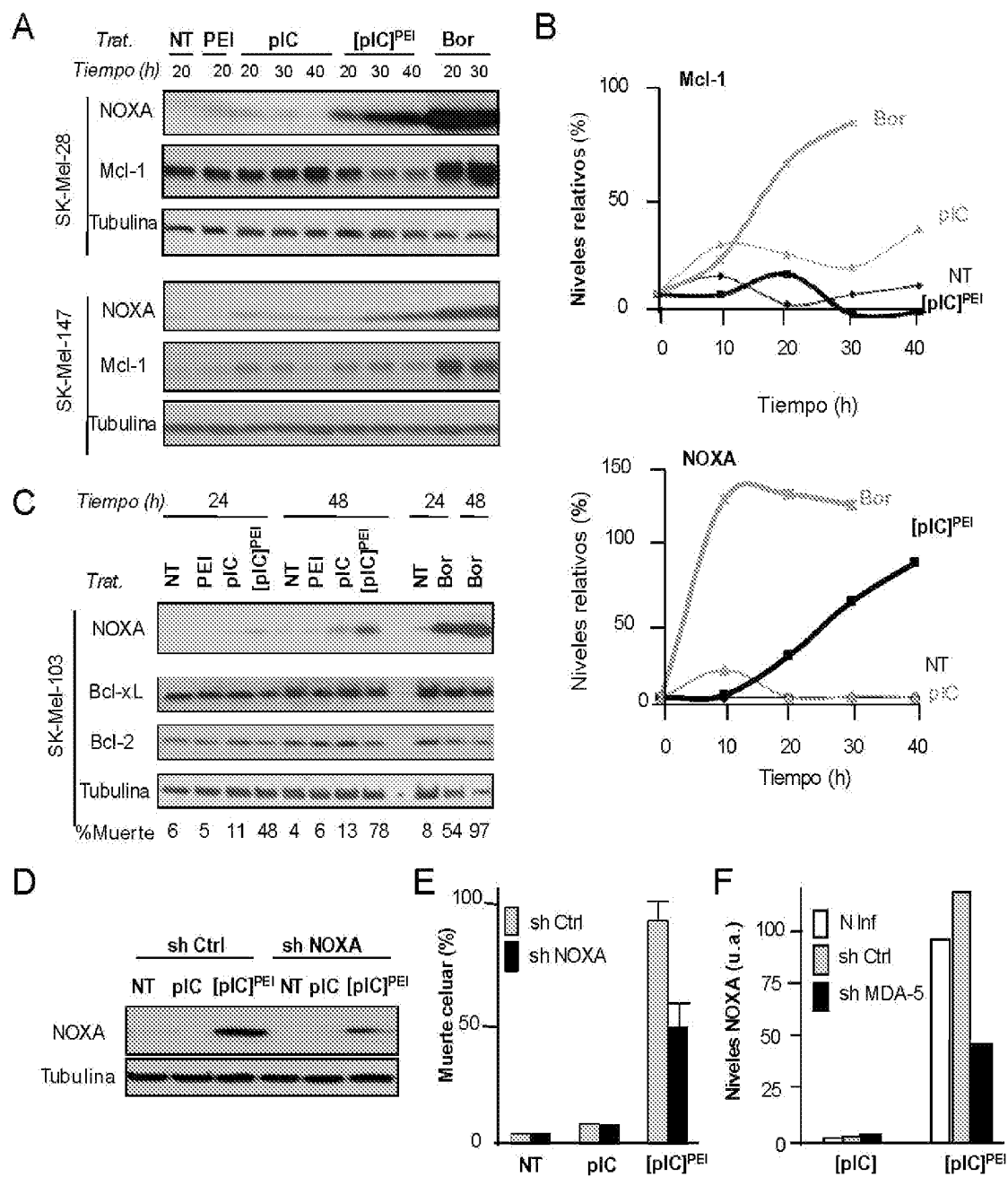


Fig. 9

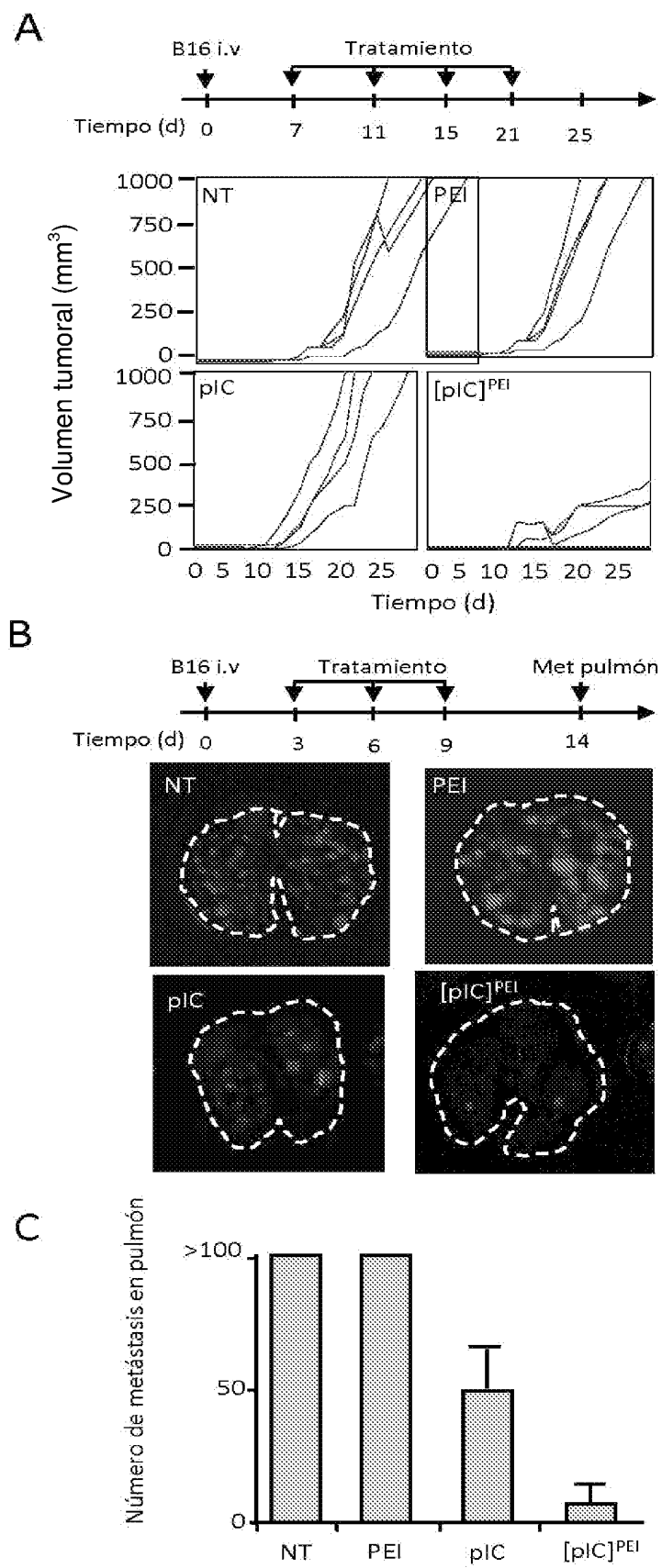
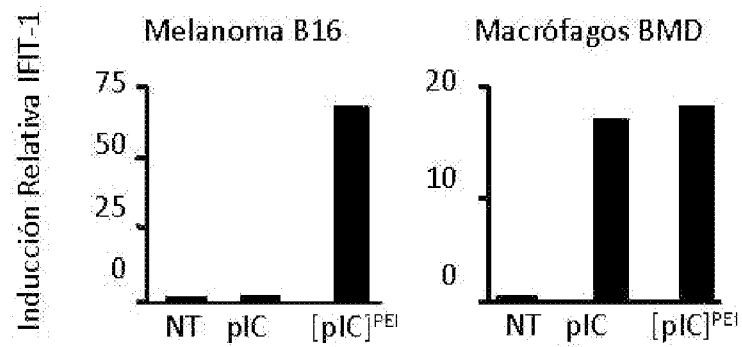
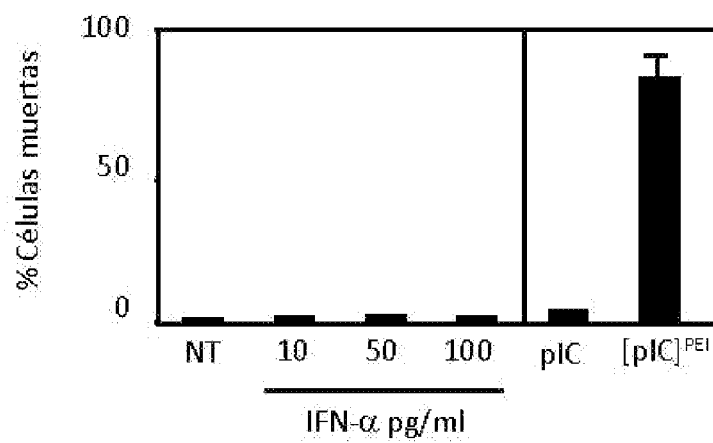


Fig. 10

A



B



C

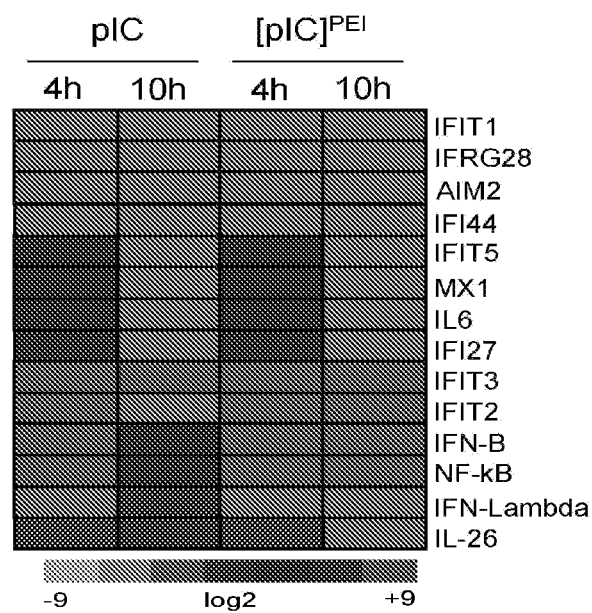


Fig. 11

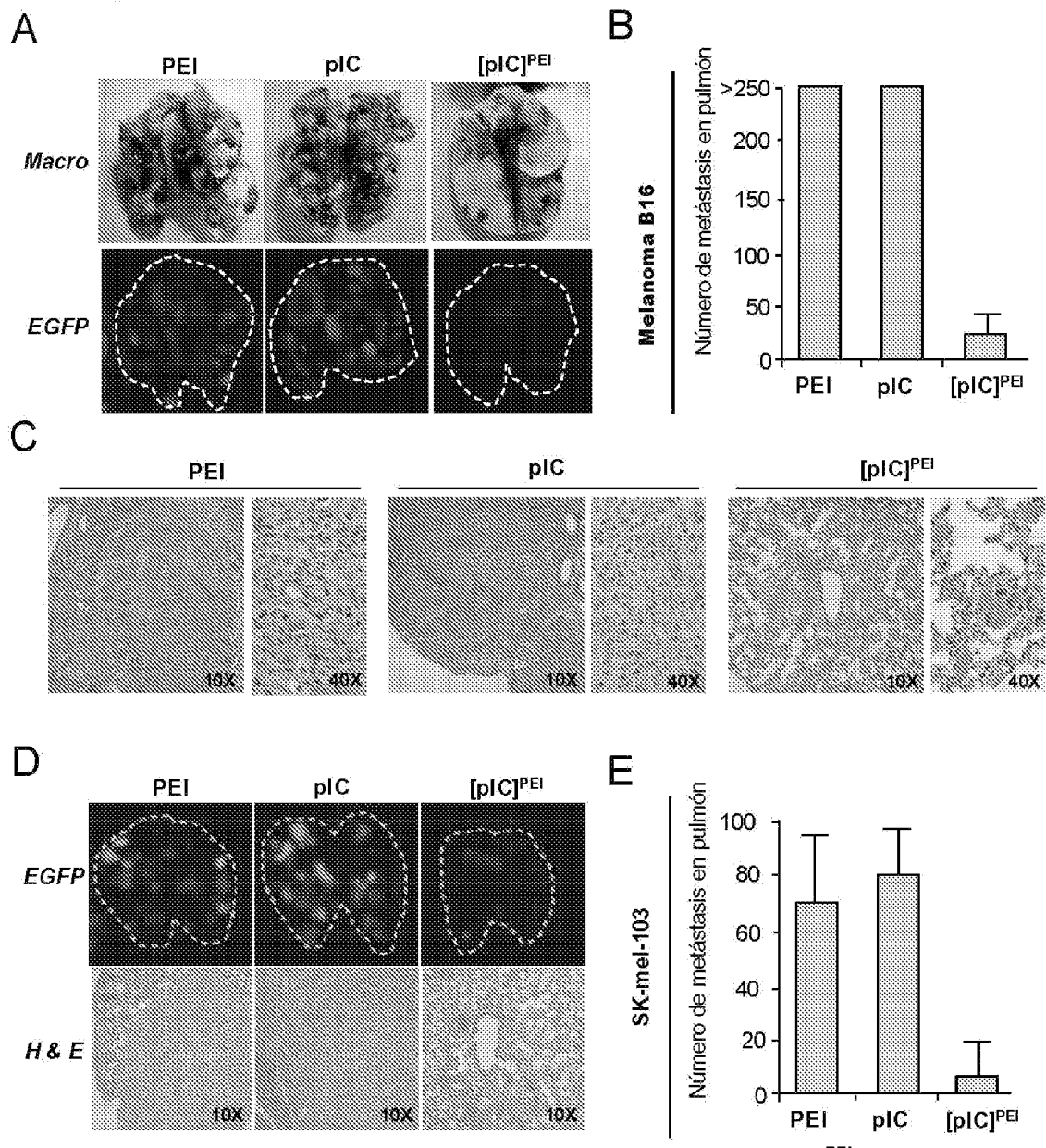


Fig. 12

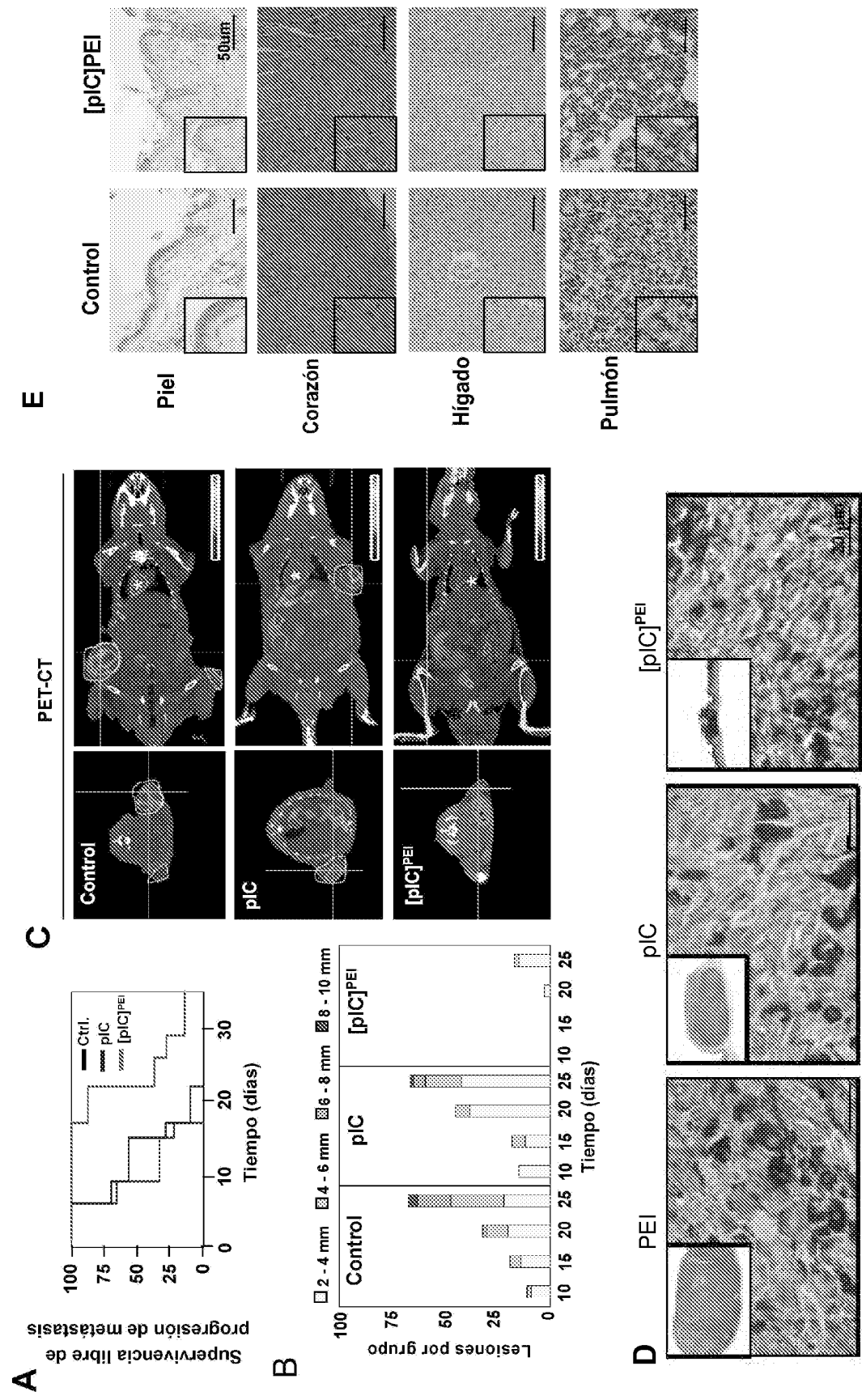


Fig. 13

ES 2 368 963 A1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Fundación Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas Carlos III	
5	<120> Procedimiento de identificación de agentes terapéuticos contra el melanoma y uso de agente identificado	
	<130> P-100841	
10	<160> 3	
	<170> PatentIn version 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
25	<223> Secuencia diana del shRNA utilizado para regular a la baja la expresión de MDA-5	
	<400> 1	
30	cgcaaggagt tccaaccatt t	21
	<210> 2	
	<211> 19	
35	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador directo de RT-PCR para detectar la expresión de MDA-5	
	<400> 2	
45	ggcaccatgg gaagtgatt	19
	<210> 3	
	<211> 20	
50	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador inverso de RT-PCR para detectar la expresión de MDA-5	
	<400> 3	
60	atttggttaag gcctgagctg	20
65		



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930417

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X,Y	WO 2004045491 A2 (YISSUN RES. DEV. CO. OF THE HEBREW UNIV. OF JERUSALEM) 03.06.2004, ejemplo 1; página 56, líneas 6-11.	1-5
X	US 2005244505 A1 (HIGBEE et al.) 03.11.2005, ejemplo 14.	1,2,5
X	WO 2006119619 A1 (REPLICOR INC.) 16.11.2006, página 16, párrafo [0076]; página 24, párrafo [0102]; ejemplo 8.	1-3,5
X,Y	ES 2228660 (INDIVUMED GMBH) 16.04.2005, página 2, líneas 1-9; ejemplos; figura 6.	1,3-5
X	US 20040028616 A1 (KNIGHT et al.) 12.02.2004, página 2, párrafos [0028],[0033],[0037].	1,2,5

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
18.10.2011

Examinador
M. Á. Martín-Falquina Garre

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/713 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

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

CIP, ECLA: A61K

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, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.10.2011

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 4
Reivindicaciones 1-3, 5

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones
Reivindicaciones 1-5

SI
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 se publica.

Consideraciones:

Los documentos de la solicitud de patente sobre los que se basa esta Opinión Escrita son el resultado de las modificaciones efectuadas durante el proceso de examen formal y técnico de la solicitud de patente.

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	WO 2004045491 A2 (YISSUN RES. DEV. CO. OF THE HEBREW UNIV. OF JERUSALEM)	03.06.2004
D02	US 2005244505 A1 (HIGBEE et al.)	03.11.2005
D03	WO 2006119619 A1 (REPLICOR INC.)	16.11.2006
D04	ES 2228660 T3 (INDIVUMED GMBH)	16.04.2005

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

Reivindicaciones 1, 2 y 5:

D1 describe diferentes complejos que comprenden la combinación de poli(IC) y PEI (ver párrafo entre páginas 46 y 47), Estos complejos son además útiles para el tratamiento de animales portadores de tumores humanos (ver ejemplo 1), y permiten el tratamiento de enfermedades malignas o autoinmunes (ver pág. 56, líneas 6-11) por lo tanto las reivindicaciones 1 y 2 carecen de novedad. La reivindicación 5 es una reivindicación de entidad, por lo que el que el medicamento sea destinado al tratamiento del melanoma debe entenderse como que es adecuado para el tratamiento del melanoma (ver pág. 26 de las Directrices de Examen de Solicitudes de Patente de la OEPM). Nada permite suponer que los complejos descritos en D1 no sean adecuados para el tratamiento del melanoma, por lo tanto la reivindicación 5 carece de novedad.

D2 describe partículas combinadas hidrofóbicas catiónicas de PLGA/PEI/poli(IC) (ver ejemplo 14) lo que puede considerarse un compuesto que comprende una combinación de dsRNA y un polication por lo tanto las reivindicaciones 1 y 2 carecen de novedad igualmente con respecto a este documento.

Reivindicaciones 3 y 4:

D3 divulga el uso de oligonucleótidos encapsulados con polietilenimina (PEI) para la fabricación de un medicamento contra enfermedades proliferativas (ver párrafo 0076 en la página 16). Estos oligonucleótidos, que pueden consistir en poli(IC) (ver párrafo 0102 en página 24), muestran un potente efecto antiproliferativo in vivo en ratones a los que se ha inyectado células de melanoma (ver ejemplo 8). Por lo tanto la reivindicación independiente 3 carece de novedad en vista de D3.

Ninguno de los documentos citados divulgan el uso de un compuesto que comprende una combinación de un fragmento de RNA de doble cadena (dsRNA) o un análogo del mismo y un portador policationico para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del melanoma en un individuo inmunocomprometido. Por lo tanto, la reivindicación 4 se considera que cumple con el requisito de novedad. Sin embargo, el documento D4 divulga complejos de RNA, con PEI y su uso para inhibir el crecimiento de xenotrasplantes de células de melanoma en ratones atímicos (ver ejemplo 4 y figura 6) y también es conocido a partir de D1 el uso de complejos poli(IC) + PEI tanto como antitumorales como para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Por lo tanto resultaría obvio para un experto en la materia probar, con una razonable expectativa de éxito, el uso de complejos de poli(IC) y PEI para el tratamiento de individuos inmunocomprometidos afectados de melanoma. En consecuencia la reivindicación 4 carece de actividad inventiva.