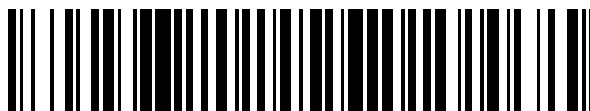


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 519 169**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2010 E 10727861 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 2424979**

54 Título: **Método de producción de proteína TRAIL antitumoral**

30 Prioridad:

28.04.2009 IT MO20090100

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

06.11.2014

73 Titular/es:

DOMINICI, MASSIMO (25.0%)

Via Belfiore 16

44100 Ferrara (FE), IT;

BUSSOLARI, RITA (25.0%);

GRISENDI, GIULIA (25.0%) y

CONTE, PIERFRANCO (25.0%)

72 Inventor/es:

DOMINICI, MASSIMO;

BUSSOLARI, RITA;

GRISENDI, GIULIA y

CONTE, PIERFRANCO

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 519 169 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de producción de proteína TRAIL antitumoral

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a un medicamento antitumoral que comprende pericitos adiposos (AD-PC) que expresan establemente TRAIL soluble (sTRAIL) de un vector retroviral.

10 **Técnica anterior**

[0002] La palabra TRAIL se conoce para definir técnicamente una molécula que pertenece a la familia de los llamados "ligandos de muerte", es decir, una familia de moléculas de factor de necrosis tumoral (TNF).

15 **[0003]** En la práctica, una molécula de TRAIL puede inducir muerte celular en tejidos enfermos solo, y dejar los tejidos sanos, y por esta característica es una molécula particularmente interesante para su uso en tratamientos oncológicos y en otros campos biomédicos.

20 **[0004]** El tratamiento basado en TRAIL de un organismo afectado por células tumorales puede producirse de dos maneras particulares: en la primera, la molécula de TRAIL se sintetiza químicamente de antemano, en cuyo caso se define como TRAIL recombinante, y después se administra al organismo afectado por el tumor; en la última, la molécula de TRAIL puede introducirse en un organismo afectado por el tumor mediante un portador que consiste en una célula productora de TRAIL.

25 **[0005]** En el primer caso, la necesidad se encontró para el uso combinado de agentes quimioterapéuticos para potenciar efectos antitumorales debido a que se ha encontrado que los últimos disminuyen progresivamente, debido a la semivida muy corta de la molécula de TRAIL, es decir, del orden de 20/30 minutos, la alta tasa de secreción renal de esta molécula y la resistencia de TRAIL. La combinación con fármacos quimioterapéuticos alenta el uso de la molécula de TRAIL recombinante debido a su capacidad de eliminación de células tumorales específica, pero esta combinación está afectada por la alta toxicidad hacia hepatocitos, linfocitos y osteoblastos, y conduce a efectos secundarios no deseados para el organismo.

30 **[0006]** Además, debido a la corta semivida y la alta tasa de secreción, se requirió la administración repetida de fármacos quimioterapéuticos en combinación con TRAIL y esto provocó un aumento considerable de los costes globales tras administraciones repetidas de TRAIL. En el último caso, la molécula de TRAIL está contenida en un virus que se usa como vector para el mismo y permite la liberación de su composición genética que contiene la secuencia codificante de TRAIL, que después se traduce en una proteína y se transfiere a la membrana de la célula infectada por tal vector viral.

40 **[0007]** Estas células infectadas se convierten en el medio que lleva TRAIL en contacto directo con células tumorales diana, produciendo así la apoptosis de las mismas.

[0008] Los vectores virales usados para esto son vectores que pertenecen a la familia de los lentivirus o adenovirus.

45 **[0009]** Las células infectadas por estos vectores pueden llevar la molécula de TRAIL a la localización del organismo en la que se requiere un efecto antitumoral, es decir, apoptosis de células neoplásicas.

[0010] Para este fin se usan múltiples tipos de células, que tienen todas un tropismo particular por sitios de enfermedad tumoral: por ejemplo, se usan citoblastos hematopoyéticos y citoblastos mesenquimatosos.

50 **[0011]** La técnica anterior desvela células humanas infectadas con un AAV2 recombinante (véase: Shi, Cancer Res. 65(5): 1687-1692 (2005)) o un plásmido (véase: Zhang, Acta Biochim. Pol 54(2): 307-313 (2007)) o una construcción genérica (véase Courtete, Int. Advanced ICAS/APOTRAIN abstract book, abstract 15 (2008)) que expresan sTRAIL.

55 **[0012]** TRAIL soluble consiste en el dominio extracelular, concretamente los aminoácidos 114-281 (véase Shi, Cancer Res. 65(5): 1687-1692 (2005)) o 95-281 (véase: Zhang, Acta Biochim. Pol 54(2): 307-313 (2007)), fusionado con un péptido señal de IgG humana (véase: Zhang, Acta Biochim. Pol 54(2) : 307-313 (2007)).

60 **[0013]** Mohr, J. Cell. Mol. Med. 12(6b): 2628-2643(2008) desvelan citoblastos mesenquimatosos humanos que expresan TRAIL de un vector de adenovirus (como una fusión con E1, para tratar tumores).

65 **[0014]** Sin embargo, esta técnica anterior todavía tiene ciertos inconvenientes.

[0015] Un primer inconveniente es que el vector viral en uso puede tener restricciones considerables de uso debido a sus propiedades biológicas.

5 [0016] Por ejemplo, si se usa un adenovirus, la mayor restricción consiste en la incapacidad del genoma viral de ser establemente integrado en el genoma de células infectadas, y esta característica genera una forma de corta duración transitoria de TRAIL, que está diseñada para agotarse, produciendo así una limitación de la duración del efecto terapéutico, como en la infusión de TRAIL recombinante.

10 [0017] Un inconveniente adicional, independiente del vector viral en uso, es que los estudios que se han realizado y publicado hasta la fecha se han referido a la aplicación de TRAIL solo como proteína transmembrana y han ignorado la existencia de un dominio biológicamente activo de la molécula incluso en forma de un ligando soluble que tiene una fuerte actividad antitumoral. Esto implicó la generación de vectores celulares que podrían solo producir células de TRAIL como proteínas membrana que pueden inducir la apoptosis selectiva de la célula tumoral diana solo mediante el contacto directo permitido por la interacción entre TRAIL sobre la célula portadora y su receptor sobre la célula tumoral diana; por tanto, la célula portadora de TRAIL de membrana debe estar necesariamente localizada en la proximidad de o en contacto con la masa tumoral para garantizar su efecto terapéutico.

20 [0018] Otro inconveniente es que la célula portadora de TRAIL de membrana localizada en la masa tumoral debe sobrevivir y proliferar durante el tiempo requerido para ejercer su acción antitumoral; así, la dosis de células que va a infundirse debe ser sustancialmente comparable al número de células tumorales que van a eliminarse, debido a que la acción citotóxica solo se produce mediante el contacto con células.

25 [0019] Como se ha mencionado anteriormente, esto produce altos costes de producción de células y puede dar lugar a efectos secundarios asociados a la infusión en el paciente.

[0020] Otro inconveniente es que la ausencia de una forma de TRAIL secretada ha prevenido estudios farmacocinéticos más intensos sobre células difusas, y la duración de su efecto con el tiempo podría no entenderse.

30 [0021] Otro inconveniente es que células portadoras tales como células derivadas de hueso-médula ósea se han usado en los estudios, sin considerar que éstas podrían producir moléculas que pueden inhibir o incluso bloquear la acción antitumoral de moléculas de TRAIL. La célula usada como portador debe producir un pequeño número de o ningún receptor señuelo (tal como OPG), es decir, receptores que pueden secuestrar TRAIL, y prevenir que se una al receptor sobre la célula tumoral.

35 [0022] Finalmente, la célula que se usa como portador, en el caso de citoblastos, no debe tener los receptores específicos de TRAIL (DR4 y DR5) que potencialmente pueden causar el suicidio de la célula portadora, y de ahí dificultar cualquier efecto terapéutico.

Divulgación de la invención

40 [0023] La presente invención mejora la técnica anterior proporcionando un medicamento antitumoral que comprende pericitos adiposos (AD-PC) que expresan establemente TRAIL soluble (sTRAIL) de un vector retroviral. Por consiguiente, la invención se refiere a:

- 45 1. Un método para la producción de un medicamento para el tratamiento de un tumor, que comprende:
- preparar un vector retroviral que codifica una molécula de TRAIL soluble (sTRAIL), y
 - transfectar establemente pericitos adiposos (AD-PC) con dicho vector retroviral.
- 50 2. El método de [1], en el que el vector retroviral se produce irreversiblemente por una línea celular productora.
3. El método de una cualquiera de [1] o [2], en el que el vector retroviral se produce constantemente y establemente por una línea celular productora.
- 55 4. El método una cualquiera de [1]-[3], en el que la célula AD-PC es una célula autóloga, alógena, humana o de animal.
5. El método de una cualquiera de [1]-[4], en el que TRAIL soluble se obtiene uniendo la secuencia codificante de TRAIL a una secuencia que codifica un péptido secretor.
- 60 6. Un medicamento antitumoral que comprende una célula de pericito adiposo (AD-PC) establemente transfectada con un retrovirus que expresa una molécula de TRAIL soluble (sTRAIL).

Breve descripción de los dibujos**[0024]**

5 La Figura 1 es una representación esquemática de diversos dominios funcionales de la construcción de Δ TRAIL, en la que:

- SS es una señal de secreción o péptido señal;
- F-CV (sitio de escisión específico de furina) es un sitio de escisión específico para la eliminación del péptido señal por escisión proteolítica después de la síntesis de proteínas;
- ILZ (cremallera de isoleucina) es un dominio de trimerización;
- hTRAILcDNA es una secuencia correspondiente a TRAIL humano de aa 114 a 281;

15 la Figura 2 de A a F son imágenes de microscopio invertido de fluorescencia (x 10 aumentos) que muestran un proceso de infección óptimo facilitado por el color normalmente verde de las células infectadas por un vector viral que expresa GFP (presencia de la proteína GFP) y en las que:

- A, B) AD-PC cultivadas con y sin fluorescencia respectivamente;
- C, D) AD-PC^{GFP} genéticamente modificadas por un vector retroviral que codifica la proteína GFP, con y sin fluorescencia respectivamente;
- E, F) AD-PC ^{Δ TRAIL} con y sin fluorescencia respectivamente;

25 la Figura 3 muestra un aspecto fenotípico de AD-PC, AD-PC^{GFP} y AD-PC ^{Δ TRAIL} cultivadas, que muestra que la manipulación de estas células con vectores retrovirales (3B, C) no cambia su aspecto (X 10 aumentos);

la Figura 4 muestra un inmunofenotipo, es decir, un análisis citofluorimétrico que muestra cómo la infección retroviral no alteró la expresión de marcadores fenotípicos característicos de AD-PC (CD45⁺, CD31⁺, CD146⁺);

30 las Figuras 5a a 5f muestran una expresión de receptores de TRAIL por análisis citofluorimétrico para definir el estado de receptor (TRAIL-R1, TRAIL-R2) de TRAIL sobre células AD-PC y sobre HeLa; particularmente, la Fig. 5a) muestra la expresión de TRAIL-R1 sobre AD-PC en una condición genéticamente no modificada; la Fig. 5b) muestra la expresión de TRAIL-R2 sobre AD-PC en una condición genéticamente no modificada; las Fig. 5c) y 5d) muestran las expresiones correspondientes de las Fig. 5a) y 5b) en una condición genéticamente modificada productora de TRAIL; las Figs. 5e) y 5f) muestran las expresiones de TRAIL R1 y R2 respectivamente, sobre células tumorales HeLa;

35 la Figura 6 muestra el un ensayo de ELISA de OPG liberada en el sobrenadante de AD-PC y MSC (citoblastos mesenquimatosos) de médula ósea, que muestra que los niveles de OPG producidos por AD-PC son mucho menores que los niveles de OPG liberados por MSC de médula ósea;

40 la Figura 7 es transferencia Western de la expresión de proteínas Δ TRAIL mostrando las columnas 1 y 2 que el anticuerpo ha resaltado una banda de aproximadamente 21 kDa correspondiente a la proteína Δ TRAIL en el lisado de proteínas y en el sobrenadante de AD-PC ^{Δ TRAIL} mientras que no se detectó ninguna banda en el lisado de proteínas AD-PC^{GFP};

la Figura 8 muestra el resultado de un análisis citofluorimétrico sobre la expresión de proteína Δ TRAIL;

la Figura 9 muestra un ensayo cuantitativo de ELISA de proteína Δ TRAIL en sobrenadantes de AD-PC, AD-PC^{GFP} y AD-PC ^{Δ TRAIL}: se detectan valores de TRAIL de 200-400 ng/ml en AD-PC ^{Δ TRAIL};

45 la Figura 10 muestra un ensayo cuantitativo de ELISA de proteína Δ TRAIL en sueros de animales con AD-PC^{GFP} y AD-PC ^{Δ TRAIL} 1x10⁵ y 1x10⁶: se detectan valores de TRAIL de 500-750 ng/ml en AD-PC ^{Δ TRAIL};

50 la Figura 11 muestra que AD-PC ^{Δ TRAIL} induce muerte celular en células HeLa. La imagen de microscopio invertido (A) muestra la presencia de cuerpos apoptóticos después de 24 horas de crecimiento de células HeLa en el sobrenadante de AD-PC ^{Δ TRAIL} (x 10 aumentos). El análisis citofluorimétrico (B) muestra un pico de células desplazado a altos valores de fluorescencia (Figura B superior) correspondiente a un acontecimiento apoptótico de HeLa en contacto con el sobrenadante de AD-PC ^{Δ TRAIL}. No se detectó acontecimiento en células HeLa en contacto con el sobrenadante de AD-PC^{GFP};

55 la Figura 12 muestra activación de caspasa-8. El cultivo de células HeLa con el sobrenadante de AD-PC ^{Δ TRAIL} induce la activación de caspasa-8 en la línea tumoral. La figura muestra que, después de 8 horas de contacto con el sobrenadante de AD-PC ^{Δ TRAIL}, el 40 % de células HeLa tiene activación de caspasa-8 (apoptosis temprana) y el 50 % es positivo para 7-AAD, que identifica células necróticas. Usando un inhibidor de caspasa-8, Z-VAD-FMK, se detiene el proceso apoptótico;

la Figura 13 muestra el peso de animales monitorizados durante 60 días de tratamiento;

las Figuras 14 y 15 muestran un ensayo de enzimas hepáticas murinas: no se han encontrado cambios apreciables en las concentraciones de AST y ALT durante 60 días de tratamiento;

60 la Figura 16 muestra la formación de una masa tumoral monitorizada tras la inoculación de AD-PC^{GFP} y AD-PC ^{Δ TRAIL}. Se encuentra que los grupos de control muestran la aparición de una masa tumoral después de 20 días, a diferencia de animales inoculados con AD-PC ^{Δ TRAIL}, en los que el crecimiento tumoral está fuertemente inhibido;

65 la Figura 17 es una representación esquemática de una fase de división celular para una célula antitumoral con un adenovirus de la técnica anterior insertado en ella;

la Figura 18 es una representación esquemática de una fase de división celular para una célula antitumoral con un adenovirus de la invención insertado en ella.

Descripción detallada de una realización preferida no limitante

5

EJEMPLO 1

[0025]

10 - Aislamiento de pericitos de fracción estromal vascular (VSF), caracterización inmunofenotípica y modificación
génica: se aislaron células AD-PC de grasa liposccionada de individuos sanos mediante digestión enzimática.
El protocolo incluye procesamiento de tejido adiposo con una disolución enzimática basada en colagenasa. El
tampón en el que la enzima liofilizada se resuspende está compuesto por el medio DMEM de baja glucosa
15 (medio Eagle modificado con Dulbecco, Euroclone) complementado con 1 % de penicilina/estreptomocina (PAA,
Laboratories GmbH). Se incubó tejido adiposo en la disolución enzimática a 37 °C. Entonces se aplica
centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos y el sedimento de células se resuspende en medio DMEM de
baja glucosa complementado con 10 % de SBF (suero bovino fetal, PAA, Laboratories GmbH) y 1 % de
20 penicilina/estreptomocina. Los adipocitos que quedan en la suspensión se eliminan usando un filtro que tiene
100 µm de porosidad (filtro de células, BD Falcon) y el filtrado se centrifuga a 1500 µm durante 10 minutos. El
sedimento así obtenido se resuspende y las células se cuentan por exclusión con azul de tripano al 0,4 %
(Cambrex) (recuento de células en una cámara Bürker usando un microscopio invertido 10 X). Las células se
siembran después en un medio patrón (PAA, Laboratories GmbH) complementado con 1 % de
penicilina/estreptomocina y 1 % de L-glutamina (PAA, Laboratories GmbH).

25 [0026] El análisis inmunofenotípico se llevó a cabo para cultivos en la etapa 4. Después de la tripsinización, las
células se sedimentaron, se resuspendieron en 100 µl de tampón de bloqueo y se incubaron durante 30 minutos a 4
°C. Entonces, la muestra se incubó con los anticuerpos de interés, se diluyó en 90 µl de PBS y 0,5 % de ABS
(albúmina de suero bovino, Sigma), durante 20 minutos a 4 °C.

30 [0027] Los antígenos cuya expresión iba a evaluarse fueron: CD45, CD31, CD146, TRAIL-R1, TRAIL- R2.

[0028] Las células así marcadas se analizaron por un citofluorímetro FAC-Scalibur (Becton-Dickinson).

35 [0029] El ensayo de ELISA permitió la cuantificación de la cantidad de OPG liberada por las células del
sobrenadante.

[0030] El sobrenadante de AD-PC y MSC de médula ósea se ensayó según el protocolo para el kit Quantikine
Human OPG/TNFRSF11B (R&D Systems, Francia) usado para este ensayo.

40 [0031] Creación del vector retroviral que codifica TRAIL soluble (Δ TRAIL): la estrategia de elección que se empleó
para clonar la molécula de SS-F-CV-ILC- Δ TRAIL en un vector retroviral fue la siguiente: el ARN total aislado de
células mononucleares de sangre periférica de un donante sano se retro-transcribió por medio de transcriptasa
inversa SuperScript™ (Invitrogen, EE.UU.) usando 2 µg de ARN total como molde y hexámeros al azar (Roche,
Alemania) como cebadores.

45 [0032] El fragmento codificante para la porción extracitoplasmática de TRAIL correspondiente a los aminoácidos
114-281 se obtuvo por PCR, de conjunto de ADNc, con cebadores especiales: 5'-
CAGATCTGGTGAGAGAAAGAGGTCCTCAGAGAGTA-3' (que contiene el sitio de escisión para BgIII) y 5'-
GGAATTCCTTAGCCAACTAAAAAGGCCCC-3' (que incluye el sitio de escisión para EcoR1). Por reacciones de
50 ligasa, la señal de secreción, el sitio de escisión específico de la secuencia señal (F-CV) y el dominio de
trimerización (ILZ) se pusieron en el extremo 5' de la secuencia del gel. El dominio de trimerización (ILZ) y el sitio de
escisión obtenido por solapamiento por PCR se digirieron por las enzimas de restricción XhoI-HindIII y HindIII-BgIII,
respectivamente. Los dos fragmentos se clonaron después junto con la porción extracitoplasmática de TRAIL en un
vector retroviral.

55 [0033] Creación de una población de AD-PC que expresa establemente la proteína Δ TRAIL soluble, y
comprobación de la expresión de proteínas por transferencia Western, análisis citofluorimétrico y ensayo de ELISA:
la creación de una población de retrovirus que puede infectar la población de células de interés representada por
AD-PC se articuló mediante dos etapas. La primera etapa se basó en la obtención de una línea celular que produce
60 el retrovirus de modo transitorio y la segunda etapa tuvo como objetivo obtener la generación de una línea celular de
encapsidación (PCL) que puede producir establemente una progenie retroviral. Para la etapa transitoria, fibroblastos
renales embrionarios (células 293T), mantenidos a aproximadamente el 70 % de confluencia, se transfectaron con
una disolución de 5 µg (en un matraz de 25 cm²) de ADN de plásmido total y con la ayuda de policationes. Después,
el sobrenadante retroviral obtenido por transfección transitoria de 293T se recogió y se usó para infectar la línea
65 celular productora (PLC) que se deriva de una línea de fibrosarcoma humano; 24 h después de la infección las

células se analizaron por citofluorimetría para comprobar la positividad de la proteína verde fluorescente (GFP), un marcador de eficiencia de infección.

5 **[0034]** El sobrenadante retroviral recogido por PCL establemente productoras de Δ TRAIL se recogió y se usó para infectar células AD-PC. Se realizaron al menos 3 infecciones, a 30 días entre sí, con la misma PCL, que muestra la estabilidad de la producción retroviral.

10 **[0035]** Se sembraron células AD-PC a una concentración de $5,7 \times 10^3/\text{cm}^2$ 12 horas antes de la infección, después de la sustitución del medio con un medio complementado con un sobrenadante retroviral y 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de polibreno, entonces las células se dejaron durante 6 horas en una estufa de incubación a 37 °C, 5 % de CO_2 . El procedimiento de infección se repitió durante tres días. Entonces, las células se dejaron en un medio patrón durante algunos días antes del análisis citofluorimétrico para comprobar la expresión de proteínas GFP. La producción de proteína Δ TRAIL por células AD-PC infectadas se evaluó por transferencia Western, análisis citofluorimétrico y ensayo de ELISA.

15 **[0036]** El análisis de transferencia Western permitió la identificación de proteínas tanto en el lisado celular como el sobrenadante.

20 **[0037]** En resumen, las células AD-PC que expresan proteína Δ TRAIL se lisaron en un tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 1 % de NP-40, 1 % de desoxicolato de Na, EDTA 1 mM, 0,1 % de SDS, inhibidor de proteasa completa). La concentración de proteína se determinó por un ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Italia), los lisados celulares y sobrenadantes de células migraron sobre gel de poliacrilamida al 8 %.

25 **[0038]** La detección de proteína se permitió por incubación del filtro de nitrocelulosa con anticuerpo policlonal de cabra anti-h-TRAIL (K-18) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., EE.UU.) como anticuerpo primario y anti-IgG de cabra-HRP (1:10000, Santa Cruz Biotechnology, Inc., EE.UU.) como anticuerpo secundario.

30 **[0039]** El análisis citofluorimétrico, que permitió la detección de la proteína en el citoplasma de la célula, se llevó a cabo del siguiente modo: aproximadamente 7 días después de la infección, las células (500.000 células/muestra) se recogieron y se permeabilizaron por Perm/tampón de lavado (BD Biosciences, EE.UU.) y luego se incubaron con el anticuerpo anti-TRAIL humano CD253 conjugado con PE (BioLegend, EE.UU.) y finalmente se analizaron por un citofluorímetro FACSCalibur (BD Biosciences, EE.UU.). El anticuerpo para IgG 1 de ratón kAs conjugado con PE (BD Biosciences, EE.UU.) se usó como isotipo de control.

35 **[0040]** El ensayo de ELISA permitió la cuantificación de la cantidad de Δ TRAIL liberada por las células del sobrenadante.

40 **[0041]** El sobrenadante de células AD-PC que expresa Δ TRAIL y las AD-PC infectadas por el vector vacío se ensayaron según el protocolo para el kit Quantikine Human TRAIL/TNFSF10 kit (R&D Systems, Francia) usado para este ensayo.

RESULTADOS 1

45 **[0042]** Con el fin de desarrollar un vector retroviral que codificara una forma de TRAIL soluble, la región codificante para la porción extracitoplasmática de la molécula, que tiene una actividad biológica proapoptósica, se fusionó con una secuencia que codifica una señal de secreción (derivada de la cadena pesada de la inmunoglobulina) y con un dominio de trimerización (Figura 1).

50 **[0043]** La disolución de TRAIL soluble así obtenida se insertó en un vector retroviral que también contiene el gen GFP. Un vector retroviral que contiene el gen GFP solo se usó como control. Estos dos vectores se usaron para transducir los pericitos aislados de tejido adiposo en vista de probar la actual actividad antitumoral de pericitos que expresan Δ TRAIL (AD-PC $^{\Delta$ TRAIL).

55 **[0044]** Se evaluó el éxito del proceso de infección de AD-PC usando un vector retroviral por microscopía de fluorescencia invertida (Figuras 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F). Los resultados óptimos del proceso de infección se confirman por la presencia de una población fluorescente completamente positiva para GFP (Figuras 2D y 2F), mientras que el control no infectado (Figura 2B) es negativo cuando se observa en el canal de fluorescencia.

60 **[0045]** Las células AD-PC se aislaron de la fracción vascular estromal (VSF) y se observaron en un microscopio que muestra una morfología de fibroblastos (Figura 3A), que no se somete a cambios tras la modificación genética (Figuras 3B y 3C). Entonces, las células AD-PC se sometieron a evaluación inmunofenotípica por análisis citofluorimétrico para comprobar la expresión de los marcadores típicos de estas células antes y después de la infección del vector retroviral. Se observa que el análisis inmunofenotípico de células AD-PC infectadas por vector retroviral (Figura 4, panel inferior en el centro) es idéntico al de células AD-PC no infectadas (Figura 4, panel superior), que indica que la infección retroviral no altera la expresión de los marcadores fenotípicos característicos

65

del vector celular seleccionado. Además, la mala expresión de TRAIL-R1 y TRAIL-R2, todavía mostrada por el análisis citofluorimétrico, justifica la selección de células AD-PC como vectores celulares para llevar TRAIL (Figura 5a). Tal expresión reducida de estos receptores, cuando se compara con la mostrada por células sensibles a TRAIL, tales como HeLa (línea celular de cáncer de cuello uterino), hace las células AD-PC insensibles a la acción apoptósica ejercida por TRAIL y protege de la muerte inducida por ligando.

[0046] Finalmente, todavía con el objetivo de evaluar la eficacia del portador de células seleccionado, los niveles de OPG liberada en el sobrenadante por células AD-PC se ensayaron por ELISA.

[0047] Como se ha mencionado frecuentemente en la materia, OPG actúa de receptor "señuelo" que significa que, como es una molécula soluble que tiene una buena afinidad de unión por TRAIL, puede unirse y secuestrarla, previniendo así cualquier interacción de la misma con los receptores TRAIL-R1 y TRAIL-R2 y de ahí que haga que se bloquee su actividad biológica.

[0048] Por tanto, la producción de grandes cantidades de OPG por la célula portada prevendría el uso de tal portador de células en una estrategia antitumoral mediada por TRAIL, debido a que la mayoría de TRAIL producido por la célula sería fácilmente secuestrado por OPG en el sobrenadante, y, por consiguiente, se perdería el efecto antitumoral.

[0049] Sin embargo, como se muestra en la Figura 6, los niveles de OPG producidos por células AD-PC, tanto como un ligando soluble en el sobrenadante como una proteína intracitoplasmática, son irrelevantes cuando se compararon con aquellos producidos por citoblastos mesenquimatosos de médula ósea MSC, que se mencionan en la materia como portadores para TRAIL, que confirma adicionalmente la novedad del uso de AD-PC como portador de células.

[0050] Las células AD-PC transducidas se ensayaron para comprobar la expresión de TRAIL real por análisis citofluorimétrico y transferencia Western.

[0051] Cuando se mira la imagen de transferencia Western (Figura 7), la banda de proteína TRAIL puede identificarse tanto en el lisado celular de AD-PC^{ΔTRAIL}, confirmando la presencia de la proteína al nivel intracitoplasmático, como en el sobrenadante, confirmando que, una vez la proteína se ha producido por la célula, es secretada en y el entorno extracitoplasmático. Esto es particularmente relevante cuando se considera que, para la aplicación sugerida, la célula sería infundida en el organismo, por lo que la secreción de TRAIL en un entorno extracitoplasmático produciría la liberación de la misma en la circulación sanguínea, conduciendo así a un efecto antitumoral sistémico independiente de la posición del portador de células con respecto a la masa tumoral.

[0052] La producción de proteínas por células AD-PC^{ΔTRAIL} también se validó sometiendo las células a análisis citofluorimétrico (Figura 8), que permitió la identificación de TRAIL al nivel intracitoplasmático, confirmando así el análisis de transferencia Western.

[0053] La siguiente etapa después de la identificación de proteínas fue la cuantificación por el ensayo de ELISA. Los valores de TRAIL liberada en medios de cultivo por células AD-PC, AD-PC^{GFP} y AD-PC^{ΔTRAIL} se ensayaron a 8, 24, 48 horas de crecimiento. Los valores detectados (200-400 ng/ml) no son susceptibles de cambios relevantes en los diferentes intervalos de tiempo. Esto puede ser indicativo de la rápida renovación de proteína: la cantidad de proteína degradada se corresponde con la de proteína producida (Figura 9).

EJEMPLO 2

[0054]

- Evaluación del efecto citotóxico de ΔTRAIL sobre células tumorales: se sembraron células tumorales HeLa en placas de 24 pocillos a una concentración de 6×10^3 /pocillo por triplicado 24 horas antes del ensayo.

[0055] El sobrenadante, que se dejó en contacto con células AD-PC^{ΔTRAIL} o AD-PC^{GFP} durante 4, 24 y 48 horas, se recogió para sustituir el medio en los pocillos en los que se habían sembrado las células tumorales. Se evaluaron la viabilidad celular y la necrosis después de 4, 24 y 48 horas por tinción con yoduro de propidio (50 μg/ml), seguido de análisis citofluorimétrico. Como control positivo, las mismas células tumorales, bajo las mismas condiciones, se pusieron en contacto con 20 ng/ml de proteína TRAIL humana soluble recombinante (Peprotech, Rocky Hill, NJ).

[0056] Ensayo de activación de caspasa-8: la activación de caspasa-8, una enzima que participa en la ruta proapoptósica temprana mediada por TRAIL, se evalúa del siguiente modo: células tumorales HeLa se ponen en contacto con el sobrenadante recogido de AD-PC^{ΔTRAIL}. También se prepara un control negativo, que consiste en la misma muestra con la adición de un inhibidor de caspasa (Z-VAD-FMK 10 μM). Después de 4 y 8 horas de tratamiento, las células se tripsinan, se resuspenden en 300 μl de PBS y se incuban durante 45 minutos a 37 °C en la oscuridad con RED-IETD-FMK (conjugado de sulforodamina). El enlace de esta molécula con caspasa-8, activada

en células apoptóticas, se detecta por fluorescencia usando un citofluorímetro.

RESULTADOS 2

5 **[0057]** Cuando se miran las imágenes de microscopio invertido que muestran la morfología de células HeLa cuando están en contacto con el sobrenadante de células AD-PC^{ΔTRAIL} (Figura 11A, superior) en comparación con la de HeLa en contacto con el sobrenadante de células AD-PC^{GFP} (Figura 11A, inferior), se encuentra envejecimiento celular en el primer caso, que se caracteriza por la presencia de un gran número de cuerpos apoptóticos y residuos que fluctúan en el medio. La mortalidad de HeLa puesta en contacto con el sobrenadante de células AD-PC^{ΔTRAIL} se
10 cuantificó por análisis citofluorimétrico usando yoduro de propidio (PI). El PI es una tinción no vital que se intercala en el ADN de células necróticas y apoptóticas avanzadas.

[0058] La representación citofluorimétrica de 24 horas de mortalidad de HeLa en contacto con el sobrenadante de células AD-PC^{ΔTRAIL} como se muestra en la Figura 11B (superior) en la que se encuentra que el pico de células
15 positivas para PI está desplazado hacia valores de alta fluorescencia en comparación con el pico correspondiente de HeLa tratadas con un sobrenadante de células AD-PC^{GFP} (Figura 11B inferior) y con el pico de HeLa que recubre placas (línea discontinua).

[0059] Un análisis más intenso confirma estos datos: células HeLa tratadas 4, 24 y 48 horas con el sobrenadante que se deriva de AD-PC^{ΔTRAIL} hiperconfluentes (30.000 células/cm²) presentan una mortalidad superior al 80 %, mientras que la mortalidad de HeLa puestas en contacto con el medio acondicionado de AD-PC^{GFP} (30.000 células/cm²) no es superior al 20 % (Figura 11). Entonces, considerando los porcentajes de mortalidad de HeLa que
20 quedan en contacto con el sobrenadante de células AD-PC^{ΔTRAIL} de menor confluencia (15.000 células/cm²), aparentemente se producirá una disminución de la mortalidad. Este resultado indica la existencia de una correlación entre la cantidad de células AD-PC^{ΔTRAIL} y la concentración de TRAIL liberada en el medio, como se ha mostrado previamente por el ensayo de ELISA. Con el fin de mostrar que la mortalidad detectada en HeLa está realmente inducida por la acción antitumoral mediada por ΔTRAIL secretada por células AD-PC infectadas, se observó la escisión de caspasa-8, que representa el primer mediador que participa en la traducción de la señal proapoptótica
25 mediada por TRAIL, en células tumorales.

[0060] El análisis citofluorimétrico mostró que, después de 8 horas, el 40 % de las células tumorales tratadas con el sobrenadante de células AD-PC^{ΔTRAIL} mostró escisión de caspasa-8, acontecimiento que representa una etapa temprana en el proceso apoptótico de la célula, y al mismo tiempo la tinción con 7AAD (análogo de propidio, tinción de muerte tardía) muestra el 50 % de células necróticas, estos valores son definitivamente superiores a aquellos
30 obtenidos con TRAIL recombinante (20 ng) que se corresponden con 8 h al 25 % para activación de caspasa-8 y 10 % para la positividad de 7AAD (Figura 12). Finalmente, con referencia a los controles tratados con el sobrenadante de células AD-PC^{GFP}, la activación de caspasa-8 y la positividad de 7AAD alcanzan valores comparables al control sin tratar. La presencia del inhibidor de caspasa-8 (Z-VAD-FMK) en sobrenadantes que contienen ΔTRAIL lleva el porcentaje de células positivas a valores comparables al control de células sin tratar o células tratadas con el sobrenadante derivado de células AD-PC^{GFP}, y se observa una situación similar. La positividad de 7AAD se evalúa en presencia del inhibidor, la muerte de células se reduce en presencia de Z-VAD-FMK. Se obtiene un comportamiento idéntico, aunque con valores de porcentaje ligeramente menores, para las 4 horas de tratamiento.
35

[0061] Estos datos confirman ambos que la mortalidad encontrada con células tumorales tratadas está realmente mediada por la acción antitumoral ejercida por ΔTRAIL secretada por células AD-PC infectadas, y refuerza los datos obtenidos por análisis con PI, que mostró a las 12 horas del tratamiento 80 % de mortalidad que se correlacionaba con el 40 % de células de apoptosis temprana (positivas para caspasa-8) y con el 50 % de células de apoptosis tardía (positivas para 7AAD) encontrada a las 8 horas (Figura 12B).
40

50 EJEMPLO 3

[0062]

- Evaluación del efecto antitumoral *in vivo* de células AD-PC^{ΔTRAIL}: para estudios *in vivo* se usaron ratones NOD. CB17-Prkdc^{scid}/J de ocho-diez semanas, según las pautas de protocolos experimentales (Prot.nº 543) aprobados por el comité ético sobre experimentación animal de la Universidad de Modena y Reggio Emilia. Se administraron subcutáneamente 2 x 10⁵ HeLa en 200 µl de PBS a los animales. El tumor desapareció aproximadamente dos semanas después, siendo su tamaño constantemente monitorizado por medio de un
55 tumorímetro. El volumen del tumor se calculó usando la fórmula: volumen = longitud x altura²/2.

[0063] Cuando el tumor apareció, los ratones se dividieron en tres grupos, que consistía cada uno en tres ratones, los animales del grupo A (grupo de control) se sometieron a manipulación adicional o incluso evaluación semanal de la masa tumoral y aumento de peso, los animales del grupo B se sometieron a tres éxitos de administración sucesivos, mediante inyección de 1 x 10⁶ AD-PC^{GFP} resuspendidas en 200 µl de PBS en la vena lateral de la cola, los animales del grupo C se sometieron a tres éxitos de administración sucesivos mediante inyección de 1 x 10⁶ AD-
60

PC^{ΔTRAIL} resuspendidas en 200 μl de PBS 9 en la vena lateral de la cola.

[0064] Al final de la prueba (60 días), los animales se sacrificaron y el tumor se extirpó.

5 **[0065]** Con el fin de evaluar la presencia de células AD-PC^{ΔTRAIL} en tejidos distintos del sitio tumoral, se realizaron biopsias en el bazo, hígado, riñón, corazón, músculo, pulmón, piel, fémur de los que se extrajo ADN.

10 **[0066]** Investigación de células AD-PC^{GFP} y AD-PC^{ΔTRAIL} en tejidos sanos de ratón: la extracción de ADN de tejido murino se llevó a cabo usando el kit de aislamiento (Gentra Systems). Con el fin de detectar la presencia de GFP de tejidos aislados, el ADN extraído se amplificó usando cebadores específicos de GFP, 5'-GTAAACGGCCACAAGTTCAG-3' y 5'-TGTCGGCCATGATATAGACG-3' (PubMed DQ768212) (fragmento 402 pb). La amplificabilidad e integridad del molde se han comprobado por amplificación del gen constitutivo GAPDH usando cebadores específicos 5'-GCAGTGGCAAAGTGGAGATT-3'; 5'-GCAGAAGGGGCGGAGATGAT-3', 308BP (PubMed XM_973383).

15 RESULTADOS 3

[0067] Los animales se monitorizaron regularmente durante la prueba para evaluar sus condiciones físicas.

20 **[0068]** Se realizó semanalmente un análisis del peso en ratones que recibieron inoculaciones de AD-PC, AD-PC^{GFP} y AD-PC^{ΔTRAIL} y no se ha notado cambio de peso considerable (Figura 13). Se encontró toxicidad hepática en la materia en asociación con la administración de TRAIL, por tanto se llevó a cabo monitorización cuidadosa de la actividad de enzimas hepáticas de animales inoculados, que no mostraron malestar hepático (Figuras 14-15). Esto es muy importante, debido a que la presencia de células que expresan ΔTRAIL al nivel sistémico (Figura 10) en el animal se probó ensayando el suero de animales por ELISA para encontrar la proteína TRAIL. En animales inoculados con AD-PC 1 x 10⁵, los niveles de TRAIL detectados son inferiores a aquellos inoculados con AD-PC 1 x 10⁶ a los sesenta días de tratamiento. Estos datos proporcionan una indicación precisa de la permanencia de células AD-PC en los animales después de varios días desde la inoculación y también de la producción de TRAIL constante de ese modo.

30 **[0069]** La administración sistémica de células AD-PC^{ΔTRAIL} después de la formación de la masa tumoral (HeLa) permitió la prueba de tanto la capacidad de migración de dichas células como su acción inhibidora del crecimiento tumoral. La Figura 16 muestra el comportamiento de la neoformación tumoral tras la inoculación de AD-PC^{GFP} y AD-PC^{ΔTRAIL}. Los grupos de control muestran un comportamiento ascendente del crecimiento de la masa tumoral desde el día quinceavo-vigésimo de la inoculación, mientras que el grupo de animales inoculados con AD-PC^{ΔTRAIL} muestra un comportamiento casi basal de la formación tumoral, que puede identificarse por una inhibición del crecimiento tumoral.

40 **[0070]** Con referencia a la Figura 17, se apreciará que, en la técnica anterior, una célula antitumoral productora de TRAIL de membrana, cuyo núcleo contiene un adenovirus que sigue en forma episómica (no integrado en el genoma de dichas células), produce dos células hijas cuando se divide, una de las cuales mantiene el adenovirus que puede producir TRAIL de membrana, mientras que la otra está completamente libre de él; esto produce un efecto de dilución de la producción de TRAIL en cada división celular.

45 **[0071]** Sin embargo, se observa en la Figura 18 que, según la invención, una célula antitumoral con un retrovirus integrado en su núcleo, que genera TRAIL soluble cuando se divide, produce dos células hijas idénticas que mantienen ambas el retrovirus integrado en sus núcleos; por tanto, ambas pueden producir TRAIL soluble, eliminando así el efecto de dilución observado en la técnica anterior.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método de producción de un medicamento para el tratamiento de tumor que comprende: preparar un vector retroviral que codifica una molécula de TRAIL soluble (sTRAIL) y transfectar establemente pericitos adiposos (AD-PC) con dicho vector retroviral.
- 2.** El método según la reivindicación 1, en el que dicho vector retroviral se produce irreversiblemente por una línea celular productora.
- 10 **3.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el vector retroviral se produce constantemente y establemente por una línea celular productora.
- 4.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que las células (AD-PC) son una célula autóloga, alógena, humana o de animal.
- 15 **5.** El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que TRAIL soluble se obtiene uniendo la secuencia codificante de TRAIL a una secuencia que codifica un péptido secretor.
- 6.** Un medicamento antitumoral que comprende una célula de pericito adiposo (AD-PC) establemente transfectada con un retrovirus que expresa una molécula de TRAIL soluble (sTRAIL).
- 20

FIG. 1

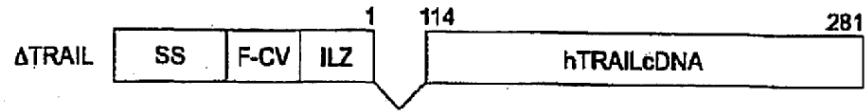


FIG. 2

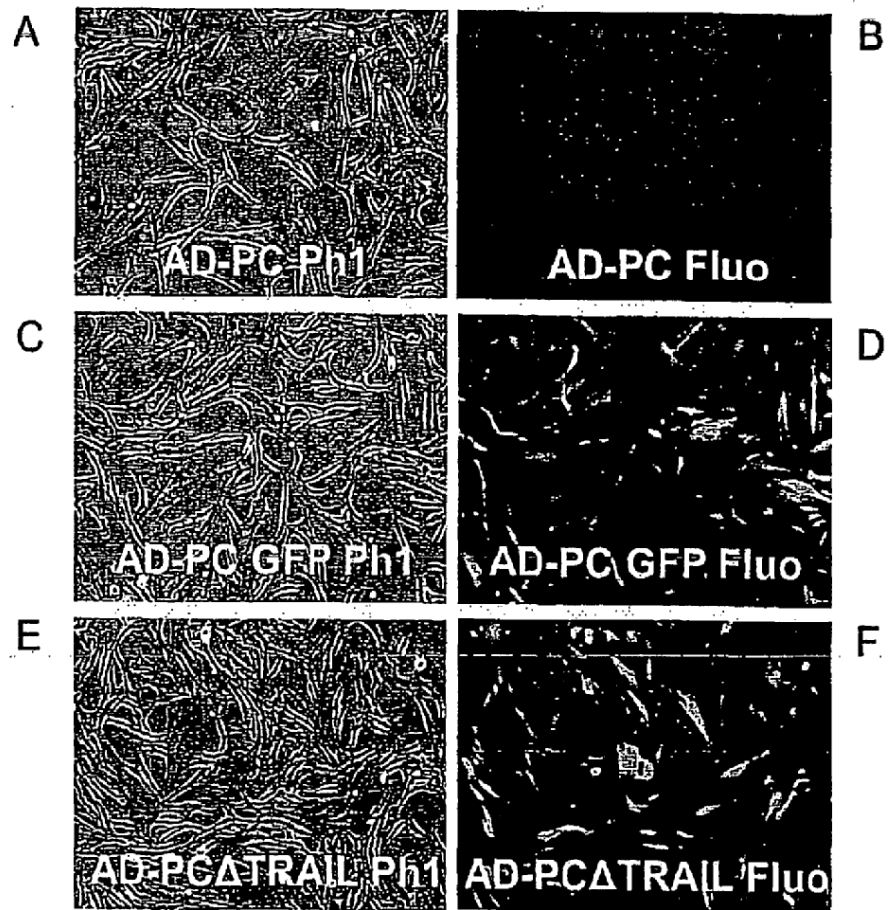


FIG. 3

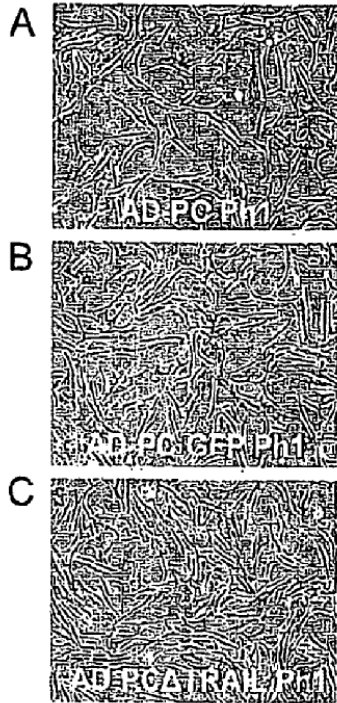
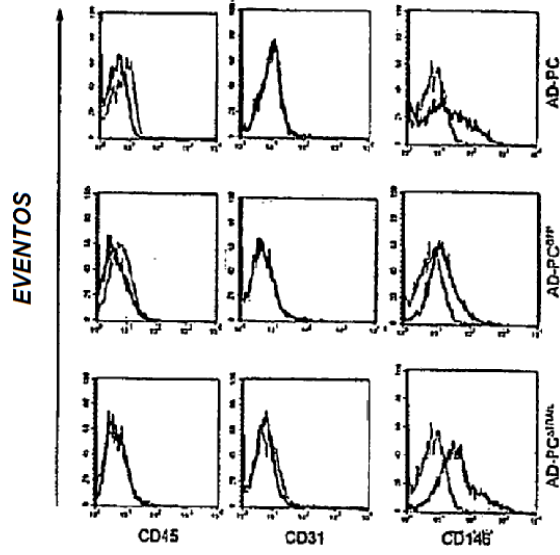


FIG. 4



Fi

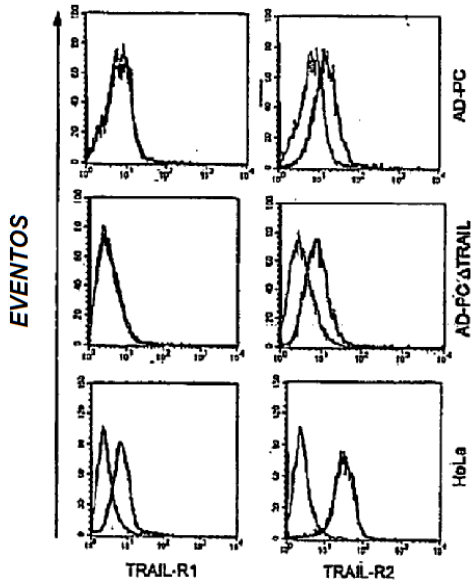
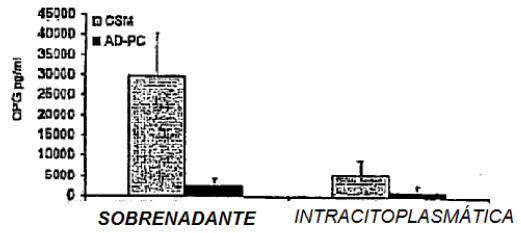


FIG. 6



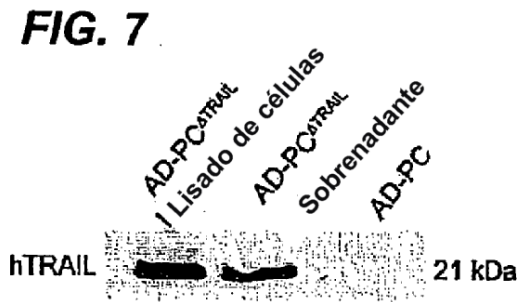


FIG. 8

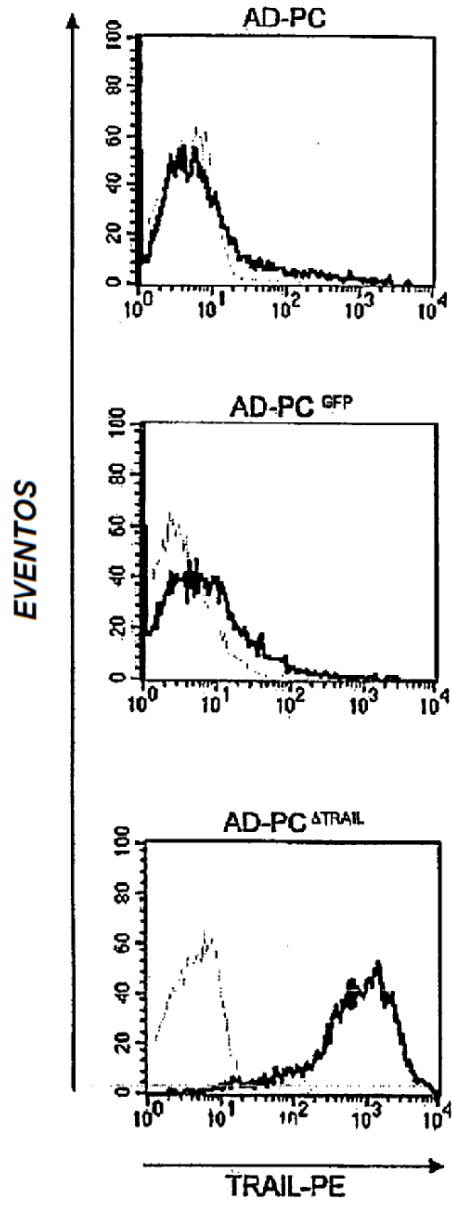


FIG. 9

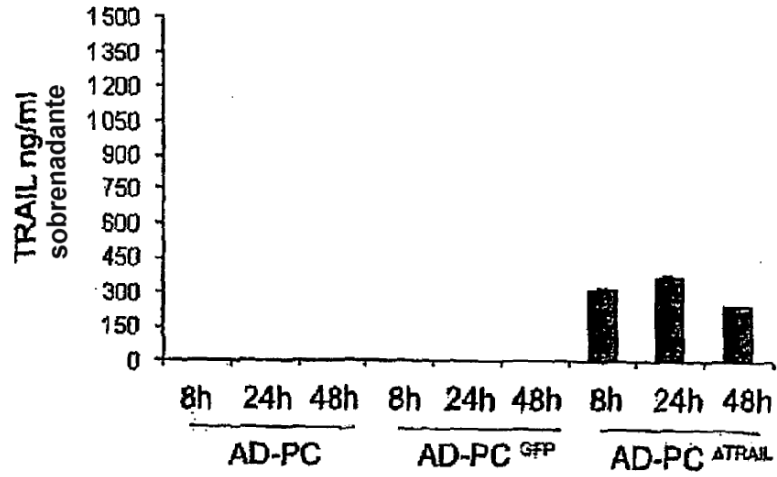


FIG. 10

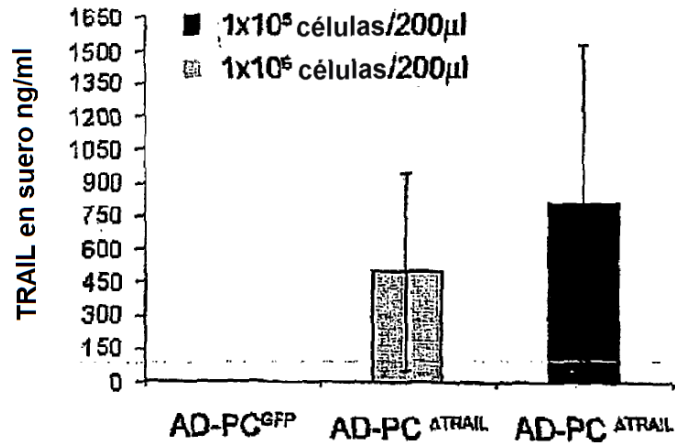


FIG. 11

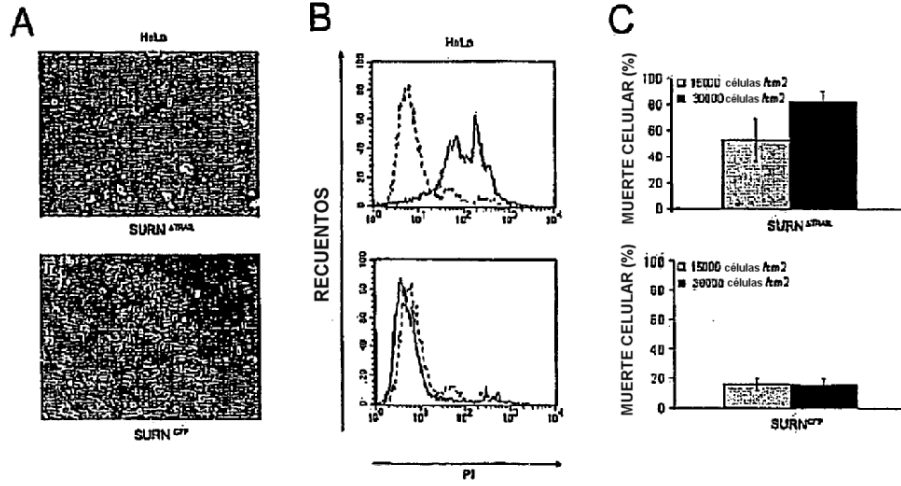


FIG. 12

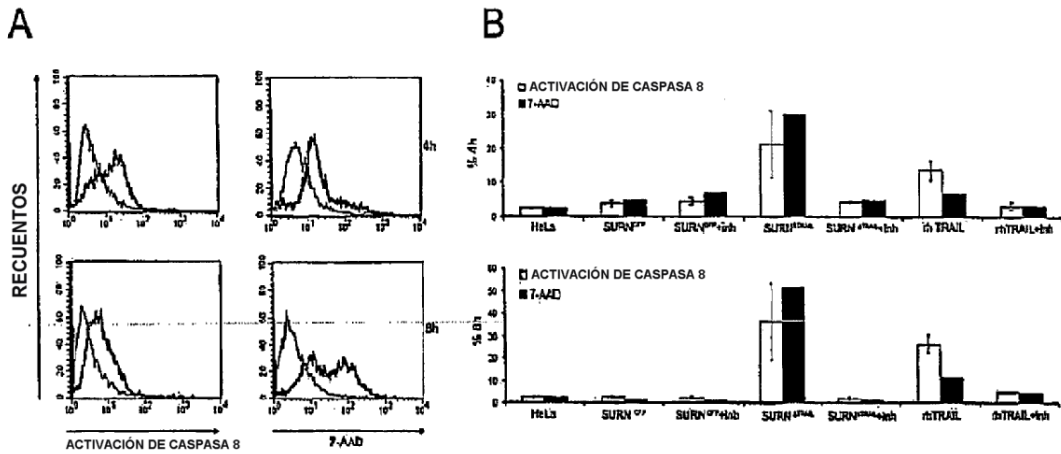


FIG. 13

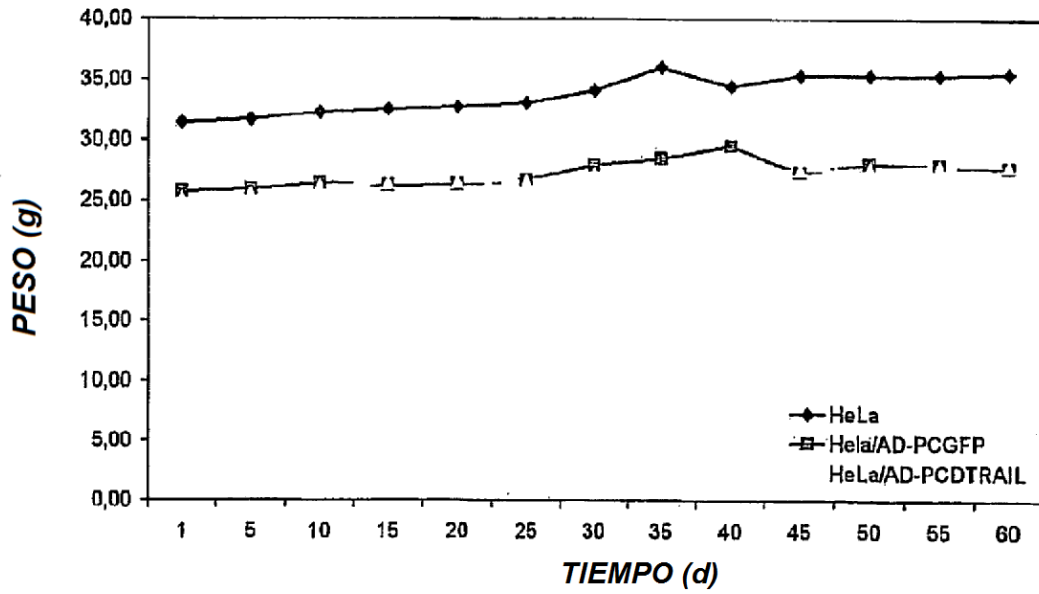


FIG. 14

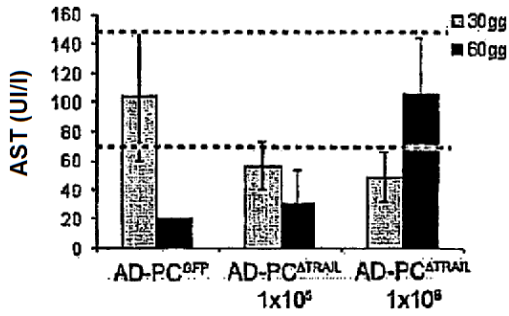


FIG. 15

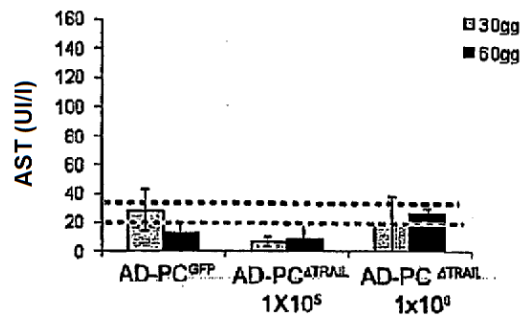
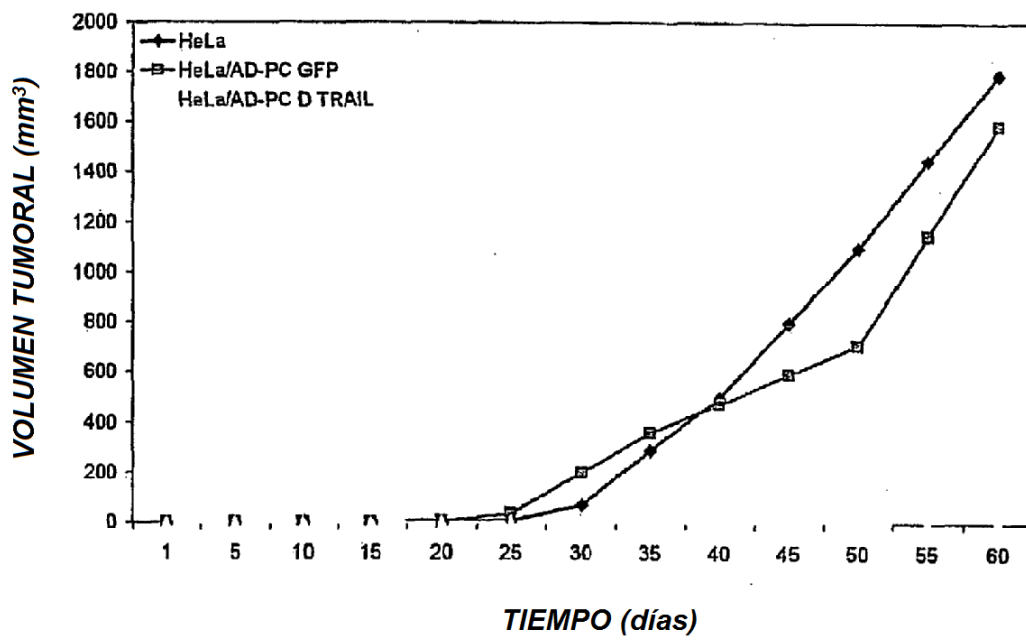


FIG. 16



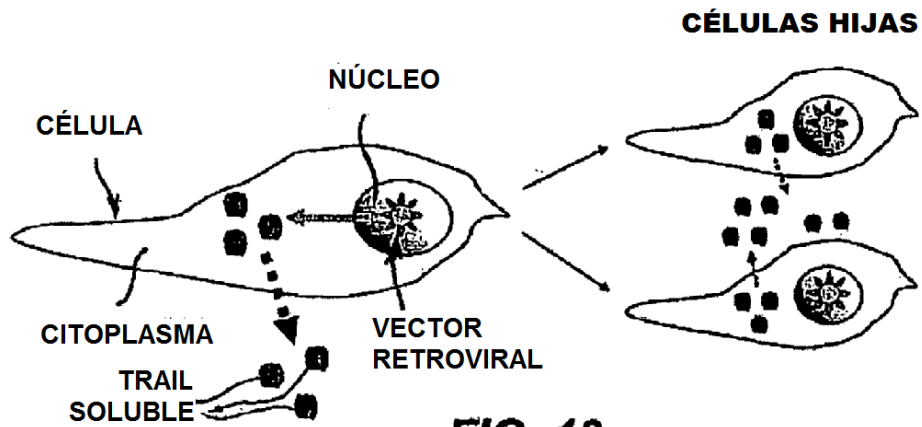


FIG. 18

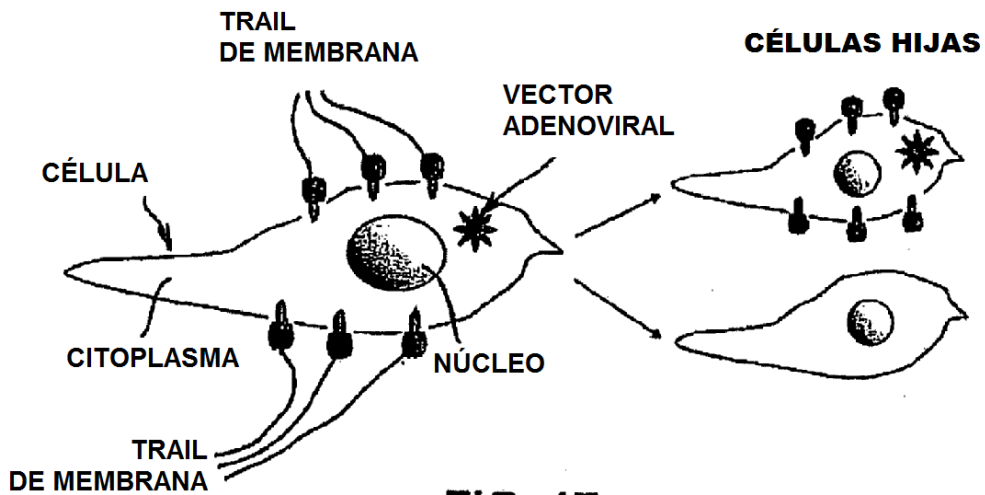


FIG. 17
(estado de la técnica)