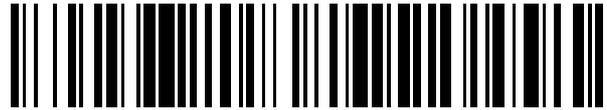


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 040**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2011 E 11835298 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2567983**

54 Título: **Variante del ligando de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral dirigido a tumores y uso del mismo**

30 Prioridad:

06.07.2011 CN 201110187700

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

08.04.2016

73 Titular/es:

**TARGETPHARMA LABORATORIES
(CHANGZHOU) CO., LTD (50.0%)
Changzhou Science City Science Hall, Room
2204 ChangWu Road, No 801, Jiangsu Province
Changzhou 213164, CN y
CHANGZHOU NANJING UNIVERSITY HIGH-TECH
TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HUA, ZICHUN;
CAO, LIN y
TANG, BO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 566 040 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

Variante del ligando de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral dirigido a tumores y uso del mismo

5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de la tecnología de ingeniería genética, y se refiere a un método de preparación y la aplicación de una variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores.

10

Antecedentes de la invención

El ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) es uno de la superfamilia de los factores de necrosis tumoral. Asimismo con otros de la superfamilia, el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF soluble es trimérico, y se une con el trimero de las moléculas aceptoras sobre la superficie de las células diana para desempeñar su acción biológica. La acción inductora de apoptosis del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF se logra transmitiendo información de muerte con receptores de muerte 4 (DR4) y receptores de muerte 5 (DR5) en las células tumorales entre sí. Aunque, la aplicación de varios de la superfamilia de los factores de necrosis tumoral está limitada a causa de su efecto toxico general, el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF es una sustancia antitumorígenica relativamente segura que tiene selectividad tumoral. In vitro, el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF puede inducir muchas células tumorales y células cancerosas a apoptosis, y tiene actividad antitumoral preferible en el xenoinjerto del tumor de ratón, que comprende el cáncer de colon, carcinoma de mama, mieloma múltiple, neuroglioma, carcinoma de próstata. De forma más importante, TRAIL muestra poca o ninguna toxicidad, cuando se administra generalmente a ratones y primates no humanos. Por las razones mencionadas anteriormente, el uso de los factores de necrosis tumoral recombinantes en el tratamiento de tumores se estudia en clínica.

Recientemente, algunos informes indicaron que, además de inducir a células tumorales a apoptosis, también, el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF está relacionado con la inmunidad natural e inmunidad adquirida, y los trastornos autoinmunitarios. Por ejemplo, las investigaciones recientes informaron de que desempeña un papel vital en el ajuste de la selección negativa y la apoptosis de los timocitos durante el desarrollo del timo, y en la inducción de los trastornos autoinmunitarios, tales como diabetes mellitus tipo I. Además, el receptor del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF puede expresarse de forma universal en el organismo completo, y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF también participa en la muerte de las células hepáticas y hepatitis. De modo que se obtendrán resultados inmunitarios impredecibles si se administra una dosis grande de proteína del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF exógeno de forma repetida y en general en clínica. A causa de estos informes, los científicos están preocupados acerca del efecto tóxico potencial resultante de administración repetida y duradera del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF en clínica. En la aplicación potencial del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) en clínica, un problema difícil a encarar es evitar el efecto tóxico a otros tejidos del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF.

Sumario de la invención

Para superar el inconveniente del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF de tipo silvestre en oncoterapia, el propósito de la invención es: proporcionar una variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores, y suministrarlo a tejidos tumorales para mejorar el efecto curativo del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y reducir su efecto tóxico, de modo sea posible usarlo en el tratamiento de enfermedades tumorales.

Está verificado por los investigadores, que la proteína aminopeptidasa N (APN)/CD13 se expresa en células endoteliales de los nuevos vasos de los tumores (Pasqualini R, Koivunen E, Kain R etc., Cancer Res, 2000, 60:722-727). Existe poca expresión de CD13 en las células endoteliales en reposo y normales de los vasos. Recientemente, se ha descubierto la relación de la aminopeptidasa N/CD13 con la metástasis y el pronóstico tumoral (Haraguchi N, Ishii H, Mimori K etc., J Clin Invest., 2010, 120:3326-3339; Fontijn D, Duyndam MC, van Berkel M Petc., Br J Cancer, 2006, 94:1627-1636; Fujii H, Naka-jima M, Saiki I etc., Clin Exp Metastasis, 1995, 13:337-344).

Para conseguir los objetivos del suministro dirigido del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF en tejidos tumorales, la mejora del efecto curativo, la reducción del efecto tóxico, la presente descripción ilustra el siguiente esquema técnico: una variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores; es una proteína de fusión de una variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF que consiste en el ligando de CD13, el péptido de conexión, el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF por el método de ingeniería genética, es decir, por síntesis artificial o recombinación del gen codificante de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, expresión recombinante soluble y separación simple y purificación, usando un método normal de ingeniería genética. Como se describe en este documento, el ligando de CD13 puede ser un polipéptido con secuencia NGR, perfectamente es un polipéptido con estructura de anillo y secuencia NGR, tal como un péptido corto de CNGRC. De acuerdo con la invención, el segmento peptídico del ligando de CD13 es el

péptido CNGRC con una estructura de anillo.

Un péptido corto de aminoácidos con construcción flexible y cadena no ramificada puede añadirse a la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores que consiste en el ligando mencionado de CD13 y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, donde, el péptido corto tiene 1~25 residuos de aminoácido y que consiste principalmente en el amino sin cadena ramificada tal como glicocola, alanina, serina, etc. Cuando el ligando mencionado de CD13 está situado en el extremo N, un aminoácido, principalmente alanina o glicocola, sin cadena ramificada se añade antes del ligando de CD13, para evitar la degradación del extremo N durante la expresión y para lograr la función del ligando de CD13.

La variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores sintetizada que consiste en el ligando de CD13 y ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF tiene una buena aplicación en la preparación de fármacos para terapia tumoral. Los fármacos para terapia tumoral preparados por la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores puede usarse en oncoterapia junto con quimioterapia, radioterapia, tratamiento por hierbas chinas, bioterapia, etc., existentes.

Además, un método de expresión soluble en *Escherichia coli* y un método simple de separación y purificación para un polímero grande de alta pureza de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores. La expresión del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores en *Escherichia coli* es principalmente el producto de cuerpos de inclusión sin actividad biológica en ese momento, sin embargo, la estructura y el peso molecular de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores de la presente invención es más complicada que el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF de tipo silvestre, de modo que habrá más cuerpos de inclusión generados, y la purificación es más difícil. En la presente invención, se usa un método de expresión de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores con cultivo y expresión inducida a baja temperatura, de modo que la generación del cuerpo de inclusión en la producción de expresión se evita de forma eficaz. Simultáneamente, de acuerdo con la función biológica del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, la presente invención obtiene producción de proteína de alta pureza mediante la unión de la cromatografía de intercambio iónico y cromatografía por afinidad de metales que hace que la purificación de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores sea eficaz. Y la producción de pureza tiene alto porcentaje de polímero, de modo que tiene actividad biológica preferida. Donde, la baja temperatura es de 35 °C-10 °C.

La CD13 se expresa en la célula endotelial de los nuevos vasos tumorales solamente, de modo que hay muy poca expresión en las células endoteliales normales en reposo de los vasos. Las recientes investigaciones indicaron que, la proteína CD13 se logra por factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y se expresa con alta selectividad en la superficie de células tumorales tales como melanoma maligno 1F6, y está muy relacionada con la invasión maligna y metástasis de tumores. Analizamos el nivel de expresión de CD13 en diferentes células por citometría de flujo, y los resultados indican que: hay una alta expresión de CD13 en células endoteliales de capilar humano, y también alta expresión de CD13 en células tumorales Hela que es una de las células de cáncer cervical humano, expresión moderada de CD13 en células cancerosas de colon HCT-15, cantidad mínima o ausencia de expresión de la molécula CD13 en células de cáncer de colon COLO-205. La variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores mencionada consiste en el ligando de CD13 y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF puede mejorar significativamente la distribución del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF en tejidos tumorales, conseguir el suministro dirigido del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF en tejidos tumorales, mejorar significativamente el efecto antitumoral del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, reducir significativamente la dosis del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF simultáneamente.

Simultáneamente, la presente invención describe un ADNc de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores. Puede prepararse añadiendo ligando codificante de CD13 y secuencia de ADN del péptido de conexión al ADNc del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF. El ADNc mencionado de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores puede usarse para terapia génica.

La variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores puede modificarse por el método de acidulado por polietilenglicol y ácido graso, recombinación añadiendo el fragmento Fc de anticuerpos o proteína-x, etc., para prolongar la semi-vida del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y obtener un efecto farmacocinético más preferido.

En comparación con el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF existente, la presente invención tiene los siguientes efectos beneficiosos:

- (1) características de direccionamiento a tumor más preferidas: La selectividad relativa del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF existente a tejidos tumorales depende principalmente de la presentación de los receptores de muerte 4 y los receptores de muerte 5 que se expresan en tejidos tumorales. Sin embargo, la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores de la presente invención

consigue el suministro dirigido de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores en los tejidos tumorales, no solamente dependiendo de los receptores de muerte 4 y los receptores de muerte 5 expresados en tejidos tumorales, sino también dependiendo de las características tumorales de alta expresión de CD13.

(2) efecto antitumoral más preferido: A causa del suministro dirigido entre tejidos tumorales del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores de la presente invención, sea en comparación con la misma dosis del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, o en comparación con la variante RGD-L-TRAIL de integrinas $\alpha V\beta 3, \alpha V\beta 5$ que está dirigida a la superficie de células tumorales (patente de invención China, solicitud n.º 200710133862.1), muestra efecto antitumoral más preferido cuando se usa por separado o junto con los métodos existentes de quimioterapia, radioterapia, tratamiento por hierbas chinas, biorremediación.

(3) menos dosificación de administración: A causa del efecto antitumoral más preferido de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores, en comparación con la misma dosis del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, cuando se usa, la dosificación de administración de la proteína de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores está significativamente reducida en el caso de asegurar el efecto antitumoral. La reducción de la dosis de administración de la proteína de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores puede superar el efecto tóxico potencial del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF cuando se usa en oncoterapia, y también puede reducir los costes de terapia de pacientes con tumor, para obtener el efecto preferido, bajo efecto tóxico, bajo coste para oncoterapia.

(4) facilidad de expresión y preparación: diferente a la proteína de fusión del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores dirigido por anticuerpo específico de células tumorales y el fragmento del mismo, la presente invención combina el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y el corto péptido de CD13, y el aumento del peso molecular está limitado. Es más beneficioso para clonación génica, expresión y preparación de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores, y el rendimiento es mayor.

(5) expresión soluble y preparación y purificación simples: La expresión del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores en *Escherichia coli* es principalmente por cuerpos de inclusión sin actividad biológica en ese momento, sin embargo, la estructura y el peso molecular de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores de la presente invención es más complejo que el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF de tipo silvestre, de modo que habrá más cuerpos de inclusión generados, y la purificación será más difícil. En la presente invención, se usa un método de expresión de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores con cultivo y expresión inducida a baja temperatura, de modo que la generación de los cuerpos de inclusión en la producción de expresión se evita de forma eficaz. Simultáneamente, de acuerdo con la función biológica del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, la presente invención obtiene producción de proteína de alta pureza mediante la unión de la cromatografía de intercambio iónico y cromatografía por afinidad de metales que hace que la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores se purifique de forma eficaz. La presente invención puede obtener la producción con pureza con alto porcentaje de polímero por expresión soluble y separación y purificación simples, para conseguir que el producto tenga actividad biológica preferida. La presente invención puede preparar la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores con alto porcentaje de polímero, que es la diferencia obvia de los estudios similares. La presente invención proporciona un método de expresión y proceso de purificación de variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores que puede obtener la expresión eficaz y alto contenido de polímero de forma eficaz.

(6) Un aminoácido sin cadena ramificada se añade al extremo 5' del ligando de CD13, de modo que la degradación del aminoácido en el extremo N puede evitarse de forma eficaz, lo que logrará la función del ligando de CD13.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1, el análisis del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF humano purificado y recombinante y variante del mismo.

1A, el resultado analítico de SDS-PAGE: 1) variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores dirigido a CD13 (NGR-L-TRAIL); 2) ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF humano; 3) variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF humano que se dirige a las integrinas de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ (RGD-L-TRAIL).

1B, el resultado analítico de PAGE no reducido y nativo: 1) variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores que está dirigido a CD13 (NGR-L-TRAIL); 2) ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF humano (TRAIL); 3) variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF humano que se dirige a las integrinas de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ (RGD-L-TRAIL).

Figura 2, el análisis de la unión de ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) humano marcado de forma fluorescente con verde y la variante dirigida a tumores del mismo (NGR-L-TRAIL) con células endoteliales microvasculares humanas, por citometría de flujo.

NGR-L-TRAIL y TRAIL del mismo, RGD-L-TRAIL, albúmina sérica bovina (BSA) como proteína de referencia están marcadas por fluoresceína. Las células endoteliales microvasculares humanas (HDMVEC) se marcan por 1 µg de proteína marcada durante 1 hora.

5 Figura 3, el análisis de la expresión de CD13 e integrinas de αVβ3 y αVβ5 sobre la superficie de células COLO-205.

3A: el análisis de la expresión de CD13;

3B: el análisis de la integrina αVβ3;

3C: el análisis de la integrina αVβ5.

10 Figura 4, el análisis de la relación dosis-efecto del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) humano y la variante dirigida a tumores (NGR-L-TRAIL) del mismo para reducir la apoptosis en las células tumorales.

4A: células Hela;

15 4B: células CLO-205;

4C: células HCT-15.

20 Figura 5, el análisis del efecto del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) humano y la variante dirigida a tumores (NGR-L-TRAIL) del mismo para la actividad de las enzimas Caspasa-8 y Caspasa-3 de las células Hela positivas de CD13.

5A: Caspasa-8.

5B: Caspasa-3.

25 Las células se tratan por separado por la variante dirigida a tumores NGR-L-TRAIL y RGD-L-TRAIL cuyo gradiente de concentración es 10~270 ng/ml durante 8 horas. Después de la inducción, las células se lisan en hielo, y se añade sustrato fluorogénico para que reaccione durante 1 hora, y después se realiza el análisis por lector de microplacas (la longitud de onda de excitación es 400 nm, la longitud de onda de emisión es de 505 nm).

30 Figura 6, la eficacia contra tumores del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) humano y la variante dirigida a tumores (NGR-L-TRAIL) en monoterapia en modelo de tumor COLO-205 y la eficacia de ese tratamiento combinado con CPT-11 en el modelo de tumor COLO-205.

6A: la monoterapia del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) humano y la variante dirigida a tumores (NGR-L-TRAIL) y RGD-L-TRAIL;

35 6B: el tratamiento combinado del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF humano y la variante del mismo con CPT-11. Los resultados del análisis estadístico se muestran por números promedio, donde, la varianza es el error típico, el asterisco * indica $p < 0,05$ y dos asteriscos ** indican $p < 0,01$.

40 Figura 7, la eficacia contra tumores del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) humano y la variante dirigida a tumores (NGR-L-TRAIL) en monoterapia en modelo de tumor COLO-205 y la eficacia de ese tratamiento combinado con CPT-11 en modelo de tumor de colon HT-15.

7A: la monoterapia del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) humano y la variante dirigida a tumores (NGR-L-TRAIL);

45 7B: el tratamiento combinado del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) humano y la variante dirigida a tumores (NGR-L-TRAIL) del mismo con CPT-11. Los resultados del análisis estadístico se muestran por números promedio, donde, la varianza es el error típico, el asterisco * indica $p < 0,05$ y dos asteriscos ** indican $p < 0,01$.

50 Figura 8, la eficacia contra tumores del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) humano y la variante dirigida a tumores (NGR-L-TRAIL) del mismo usados en solitario y junto con CPT-11 en el modelo de tumor de colon HT-29 que es insensible a TRAIL.

Figura 9, la comparación del efecto de enriquecimiento dirigido del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) humano y la variante dirigida a tumores (NGR-L-TRAIL) del mismo, y RGD-L-TRAIL en el tejido tumoral del modelo animal COLO-205 de tumor.

55 Se administran 100 µl/5 mCi del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) humano y la proteína variante dirigida a tumores del mismo por separado por inyección intravenosa en la cola a ratones desnudos con tumor COLO-205. El tejido tumoral se retira y se pesa a los 5, 30, 60, 120 y 240 minutos después de la inyección por separado. Se detecta la cantidad de radiación de isótopos en el tejido tumoral por recuento de centelleo líquido, donde, la unidad de la cantidad de radiación del tejido tumoral es el porcentaje de la cantidad de radiación detectada en la cantidad de radiación de inyección, en base a un gramo de tejido (% ID/g). Todos los resultados son valores promedio de tres experimentos por separados.

60 Figura 10, la distribución detectada del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) humano y la variante (NGR-L-TRAIL) del mismo marcado por isótopo ¹²⁵I en el tejido animal.

65

Descripción detallada de la invención

Realización 1:

5 La preparación de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores

En base a la estructura cristalina del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, se añade el péptido corto del ligando de CD13 al extremo N del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, por modelado de estructura asistido por ordenador y diseño molecular, y por la terminal informática SGI donde se utilizan softwares de
 10 diseño de moléculas (el módulo de InsightII, Discover etc.) de la empresa MSI. Y se determina la longitud de aminoácidos del péptido de conexión por modelado molecular y diseño de moléculas.

En base al diseño molecular mencionado anteriormente, en primer lugar, se elige el esquema de diseño donde el péptido de conexión tiene 5 glicocolas, porque el modelado informático indica que: el péptido de conexión es corto en este esquema, de modo que no afectará significativamente a la estructura proteica del ligando inductor de
 15 apoptosis relacionado con TNF y la unión de CD13 y el ligando del mismo. Los péptidos de conexión en otros esquemas casi cubren la distancia entre el ligando de CD13 y la superficie molecular del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, de modo que la alteración y el efecto son ligeros.

También se intenta la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores donde se expresa la alanina o glicocola, el péptido corto de alanina-glicocola-glicocola-serina-serina-glicocola-glicocola-glicocola como péptido de conexión, y la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores con 25 residuos de aminoácido que contienen la repetición de tres mencionada glicocola-(alanina-glicocola-glicocola-serina-serina-glicocola-glicocola-glicocola)³, y se obtienen resultados similares. Se verifica la co-relación
 20 del diseño molecular informático. Comparativamente, el nivel de expresión de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF es el más elevado (100 mg/l) cuando se añaden 5 cisteínas, y otros son más bajos, pero están entre aproximadamente 50-100 mg/l.

Durante el diseño molecular asistido por ordenador de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores, en base a la estructura cristalina del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, se planeó el modelado molecular y diseño molecular sobre la secuencia de aminoácidos y la longitud del péptido de conexión entre el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y el ligando de CD13, mediante modelado estructural y diseño molecular de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores, para determinar la longitud de aminoácidos del péptido de conexión. Los resultados indican que: durante el
 30 diseño molecular por ordenador, entre la longitud del péptido corto de 1-25 aminoácidos, si el péptido corto consiste en el resto de aminoácido flexible sin cadena ramificada, tal como glicocola, alanina, serina, etc., ni la estructura del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF ni la función del ligando de CD13 se verá afectada de ningún modo. Con la longitud del péptido corto de 25 residuos de aminoácido flexibles sin cadena ramificada, la excitación de la estructura del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF es más ligera cuando la longitud del péptido
 35 corto es más pequeña. De forma comparativa, si la longitud es demasiado pequeña, habrá algún efecto a la estructura del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, y la unión del CD13 y el ligando del mismo se verá afectado también.

El gen del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF humano de tipo silvestre se prepara por transcripción inversa de ARN que se obtiene de placenta humana. Las secuencias de nucleótidos de los cebadores de PCR del gen de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF unido al péptido corto CNGRC son:

Cebador1: 5'-GGAATTCCATATGTGCAATGGTCGTTGCGGTGGTGGTGGTGTGAGAGAAAGAGGTCCTCAG-3';
 Cebador2: 5'-ATGGATCCTTAGCCAATAAAAAGGCC-3'.

Por reacción de PCR, se obtiene el gen de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores (NGR-L-TRAIL) que codifica el péptido corto CNGRC y el péptido de conexión que consiste en 5 glicocolas. El gen de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores (NGR-L-TRAIL) se clona en el vector de expresión pET-23a de Novagen Company, y el plásmido de expresión recombinante
 55 obtenido se expresa en *Escherichia coli* BL21(DE3). Para obtener la expresión soluble de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores NGR-L-TRAIL, las condiciones de expresión son las siguientes: se diluyen las bacterias de expresión recombinantes cultivadas durante una noche en 100 veces en medio de cultivo LB, y se cultivan durante 2,5 horas a 37 °C, y después se cultivan durante 1-2 horas a 24 °C; se añade IPTG a 24 °C a su concentración de 0,5 mM, y después se realiza la expresión inducida a 24 °C durante una noche. Después de la separación por centrifugación, las bacterias se suspenden en lisado (fosfato
 60 sódico 50 mM, cloruro sódico 0,5 M, ditiotreitól 1 mM, pH 7,6) y se alteran por ondas ultrasónicas.

La proteína de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores recombinante NGR-L-TRAIL se purifica pasando al sobrenadante en resina catiónica SP-sepharose y se recoge el pico de elución en NaCl 300 mM. La proteína eluida se purifica adicionalmente por cromatografía de afinidad con gel de agarosa Ni-NTA como medio, donde la proteína se eluye por imidazol 250 mM y se desala por Sephadex G-25. El agua usada en

el experimento es agua de súper-pureza con las endotoxinas retiradas. La cantidad de la proteína se determina por el kit de ensayo de proteína BCA proporcionado por Nanjing JianCheng Bioengineering Institute. La pureza de la proteína y el peso molecular del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y la variante dirigida a tumores del mismo se determinan por tinción con plata de SDS-PAGE, y se identifica el peso molecular por análisis de espectrometría de masas (Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer).

La configuración, expresión y pureza de la variante RGD-L-TRAIL de integrinas $\alpha V\beta 3, \alpha V\beta 5$ se ejecuta de acuerdo con la solicitud de patente de invención China 200710133862.1.

En los últimos informes, el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF de tipo silvestre expresado en *Escherichia coli* a menudo es la forma de producto de cuerpos de inclusión sin actividad biológica, pero la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores de la presente invención, al cual se añaden 4 cisteínas (es decir, dos enlaces disulfuro), puede generar cuerpos de inclusión más fácilmente cuando se expresa en *Escherichia coli*, en comparación con el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF de tipo silvestre, de modo que la purificación es más difícil. Mediante la modificación de las condiciones de expresión y separación y purificación, la presente invención consigue la expresión soluble de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores. Y a causa de la purificación por cromatografía en resina de intercambio catiónico y cromatografía de afinidad con metal níquel, se obtiene proteína de alta pureza de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores con actividad biológica, y el rendimiento es de 100 mg/l. tanto el análisis (Figura 1A) de tinción con plata de electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % en condiciones de desnaturalización y reducción como el análisis de secuenciación por espectrografía de masas identifican la corrección del producto de expresión. La relación del polímero en el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y la variante del mismo es elevada (Figura 1B), lo que es raro en la expresión y pureza del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y los trabajos similares.

Todas las proteínas de la superfamilia de TNF tiene las características de formar monómeros, dímeros y trímeros, y cuya actividad biológica depende del dímero y trímero, así como el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF. Para determinar si la unión del CNGRC afectará a la capacidad de formar polímeros de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores, se realiza electroforesis en gel de poliacrilamida natural no reductor y el resultado del análisis indica que: la proteína del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y la variante dirigida a tumores del mismo tienen la capacidad de formar polímeros. Los resultados muestran que el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y la variante dirigida a tumores del mismo y RGD-TRAIL aparecen en tres bandas correspondientes al peso molecular de aproximadamente 20000, 40000, y 60000 dalton. Y las tres bandas representan el monómero, dímero y trímero por separado (Figura 1B). Eso indica que: la proteína del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y la variante dirigida a tumores que se expresan y purifican por la presente invención tienen estructuras espaciales correctas y mejor actividad biológica que el TRAIL presentado expresado en *Escherichia coli* en el pasado.

Realización 2:

El experimento de la unión del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y células endoteliales.

El ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y la variante dirigida a tumores del mismo NGR-L-TRAIL, y RGD-L-TRAIL se marcan por fluoresceína (Sigma Company) por separado, y se retira la fluoresceína nómada de las proteínas marcadas por el tamiz molecular Sephadex-G25. Después de digestión con pepsina, las células endoteliales de microvasculatura de prepucio humano se lavan por tampón fosfato frío que contiene un 2 % de suero bovino fetal, y después se suspenden de nuevo. Se añade 1 μ g de proteína marcada, y se realiza incubación en hielo a 4 °C durante 1 hora. Las células teñidas se lavan 3 veces y se analiza la capacidad de unión por citometría de flujo (Becton Dickinson Company) con albúmina sérica bovina marcada por fluoresceína como control.

También se evalúa la capacidad del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y la variante dirigida a tumores del mismo marcados por fluoresceína, y la variante de TRAIL NGR-L-TRAIL (número de patente de invención China ZL200710133862.1) dirigidos a las integrinas de $\alpha V\beta 3, \alpha V\beta 5$ de unirse con las células endoteliales microvasculares de prepucio humano directamente. Los resultados detectados de la citometría de flujo indican que: la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores NGR-L-TRAIL tiene una capacidad más fuerte de unirse con las células endoteliales microvasculares de prepucio humano que la variante de TRAIL RGD-L-TRAIL dirigida a las integrinas de $\alpha V\beta 3, \alpha V\beta 5$. Eso indica que: el péptido corto del ligando de CD13 puede mejorar la capacidad de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores de unirse con las células endoteliales; e incluso la capacidad de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores de unirse específicamente con las células endoteliales es más fuerte que la capacidad de la variante de TRAIL RGD-L-TRAIL dirigida a las integrinas de $\alpha V\beta 3, \alpha V\beta 5$ de unirse específicamente con las células endoteliales (Figura 2). Habiendo CD13 e integrinas de $\alpha V\beta 3, \alpha V\beta 5$ durante la expresión en células endoteliales microvasculares humanas se descubrió por diferentes investigadores, pero en primer lugar, en la presente invención, la abundancia del CD13 y las integrinas de $\alpha V\beta 3, \alpha V\beta 5$ en las células endoteliales microvasculares humanas se comparan y la presente invención descubre que la abundancia de expresión de CD13 es mayor que la abundancia de integrinas de $\alpha V\beta 3, \alpha V\beta 5$ de forma significativa, y descubre adicionalmente que

CD13 es un tipo de molécula diana dirigida más preferida para las células endoteliales microvasculares humanas que las integrinas de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$. Las integrinas de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ son el marcador más reconocido de nuevos vasos de forma internacional, y se usan ampliamente las agluconas que contienen secuencia RGD como sonda para diagnosticar el crecimiento prematuro de tumor y la metástasis prematura del tumor. En la presente invención primero se demuestra que CD13 es un tipo de molécula diana dirigida más preferida que las integrinas de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$, y CD13 como diana tumoral conseguirá un efecto más preferido que las integrinas de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$. Esto es un resultado de lo esperado por los científicos de este campo, y un resultado de lo que esperamos, de modo que es una de las importantes innovaciones de la presente invención.

10 Realización 3:

El análisis de la expresión de CD13 e integrinas de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$

Se detecta la abundancia de expresión de CD13 y las integrinas sobre la superficie de células por citometría de flujo de acuerdo con el método de marcaje indirecto. En el mismo, las células digeridas se lavan por tampón fosfato frío que contiene un 2 % de suero bovino fetal, y después se suspenden de nuevo, las células se emparedan por anticuerpo monoclonal anti-CD13 humano (eBioscience Company) o anticuerpo anti-integrina $\alpha V\beta 3$ humana MAB23C6 (eBioscience Company) o anticuerpo anti-integrina $\alpha V\beta 5$ humana MAB 1961 (Chemicon International Company) durante 1 hora en hielo, con inmunoglobulina G de ratón de isotipo purificada (eBioscience Company) como control negativo. Después de lavarse dos veces, las células emparedadas por anticuerpo primario se marcan añadiendo anticuerpo secundario de oveja anti-inmunoglobulina G1 de ratón (y) (Caltag Laboratories) acoplada a fluoresceína verde durante 30 minutos en la oscuridad. Las células se lavan tres veces y se fijan en tampón fosfato que contiene un 4 % de formalina. Las abundancias de expresión de CD13 y las integrinas de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ se detectan por citometría de flujo, y todos los experimentos de tinción se repiten 3 veces.

CNGRC, que es el ligando de CD13 que puede formar dos enlaces disulfuro, y contiene la estructura de anillo y la secuencia NGR, tiene afinidad y selectividad preferida por CD13. Como la diana está diseñada hacia CD13 en la presente invención, los resultados de expresión de CD13 sobre la superficie de células endoteliales y células tumorales se analizan por nosotros, y los resultados del análisis indican que: existe un alto nivel de expresión de CD13 sobre la superficie de células endoteliales microvasculares de prepucio humano, e incluso el nivel de expresión de CD13 sobre la superficie de células endoteliales microvasculares de prepucio humano es mayor que el nivel de expresión de integrinas de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$. Además, es importante observar que: hay expresión de CD13 en diferentes células tumorales en estados variables, donde, existe un alto nivel de expresión de CD13 en HDMVEC y Hela, abundancia intermedia de expresión de CD13 en células de cáncer de colon HCT-15, muy poca o ninguna expresión de CD13 en células de cáncer de colon COLO-205.

CD13 y las integrinas de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ se expresan sobre la superficie de células vasculares tumorales y tumorales, sin embargo, ¿cuál es una mejor diana para abordar tumores cuando se compara CD13 y las integrinas de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$? Nadie detalló investigaciones y comparaciones acerca de ello. En la presente invención, se comparan los niveles de expresión de CD13 e integrinas de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ sobre la superficie de células vasculares tumorales y tumorales, y se analiza la actividad antitumoral del NGR-L-TRAIL que es la variante de TRAIL dirigida a CD13 y el NGR-L-TRAIL que es la variante de TRAIL dirigida a las integrinas de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ a nivel celular y a nivel de modelo animal y se encuentra un resultado sorprendente que es contrario a lo esperado. Por comparación de la expresión de CD13 y las integrinas de $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ sobre la superficie de COLO-205, descubrimos que: existe muy poca expresión de CD13 sobre la superficie de COLO-205, pero existe un bajo nivel de expresión de integrina $\alpha V\beta 3$ y un alto nivel de expresión de integrina $\alpha V\beta 5$ (Figura 3). Correspondiente con esto, la actividad de inducción de COLO-205 a apoptosis de la variante de TRAIL NGR-L-TRAIL dirigida a CD13 está aumentada por un poco (Figura 5B), y la actividad de inducción de COLO-205 a apoptosis de la variante de TRAIL NGR-L-TRAIL dirigida a las integrinas $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ está aumentado en 10 veces (hacia la célula COLO-205, la concentración eficaz al 50 % de TRAIL es 3,5 ng/ml, la concentración eficaz al 50 % de RGD-L-TRAIL es de 0,37 ng/ml). Por tanto, considerando si el nivel de expresión en la diana sobre la superficie de células COLO-205, o el nivel aumentado de la concentración eficaz al 50 % de NGR-L-TRAIL y RGD-L-TRAIL hacia las células COLO-205, RGD-L-TRAIL es muy superior a NGR-L-TRAIL. Pero en el experimento del modelo de tumor COLO-205 *in vivo*, el efecto antitumoral de NGR-L-TRAIL es significativamente superior a RGD-L-TRAIL cuando se usa con la misma dosificación, e incluso el efecto antitumoral de una dosificación de 1/5 veces (20 μ g) de NGR-L-TRAIL es equivalente al efecto antitumoral de una dosificación de 5 veces (100 μ g) de RGD-L-TRAIL. Los resultados nos dicen claramente que: no puede llegarse a conclusión y deducción de actividad antitumoral de los fármacos antitumorales en base a la actividad obtenida del experimento *in vitro* y nuestra lógica y comprensión normal, sino que debe comprobarse gradualmente a través de experimentos científicos sin ostentación, y no debe ignorarse cada experimento de este procedimiento. En la presente invención, muchos experimentos *in vitro* muestran que la actividad antitumoral de RGD-L-TRAIL es significativamente superior a NRG-L-TRAIL, pero se obtiene el resultado opuesto de experimentos antitumorales del modelo de tumor en animales *in vivo*.

Realización 4:

Detección de apoptosis celular por método de tinción doble de anexina (Anexina V) e yoduro de propidio

- 5 Las células tratadas por el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y la variante dirigida a tumores del mismo NGR-L-TRAIL, y RGD-L-TRAIL se digieren por tripsina y se eliminan por succión de la placa de cultivo, y después de lavarse dos veces por tampón fosfato, las células se centrifugan a 300 g de fuerza centrífuga durante 5 minutos. El sobrenadante se retira y las células se suspenden de nuevo por 100 μ l de tampón de unión. Se añade Anexina V-FITC (BD Pharmgen Company) cuya concentración final es 2 μ g/ml, y las células se incuban a temperatura ambiente. Después de 10 minutos, se suplementan 400 μ l de tampón de unión. Las células se transfieren a un tubo de análisis de flujo, y se añade 1 μ g de yoduro de propidio (Sigma Company) en cada uno de los tubos. Las células se analizan por citometría de flujo en 30 minutos. El experimento se repite tres veces para cada línea celular.
- 10
- 15 La actividad de inducir la apoptosis de células tumorales de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores NGR-TRAIL se evalúa usando células COLO-205, HCT-15 y HT-29 por separado (Figura 4). Después de inducirse por un gradiente de concentración en serie de la variante de TRAIL o TRAIL, las células tumorales se detectan por citometría de flujo de acuerdo con el método de doble tinción de Anexina V-FITC y PI. El resultado muestra que: la sensibilidad de diferentes células tumorales a TRAIL es diversa, donde, las células COLO-205 son más sensibles, las células HCT-15 son las segundas, y las células Hela son relativamente no sensibles. Sin embargo, en células Hela, la actividad para inducir apoptosis de células tumorales del NGR-L-TRAIL está aumentada significativamente. La concentración eficaz al 50 % (CE50) de NGR-L-TRAIL para células Hela es aproximadamente de 18,5 ng/ml, la concentración eficaz al 50 % (CE50) de TRAIL para células Hela es de aproximadamente 145 ng/ml. La sensibilidad de células Hela a TRAIL está aumentada 8 veces a causa de la adición del péptido corto. Para COLO-205 y HCT-15, la actividad de inducir apoptosis de células tumorales de NGR-L-TRAIL es mayor que la de TRAIL un poco. Existe una corrección positiva entre la diferencia de la inducción de apoptosis para estas células tumorales entre NGR-L-TRAIL y TRAIL y la expresión y la abundancia de la molécula CD13 sobre la superficie de las células tumorales. En las células tumorales Hela en que el nivel de expresión de CD13 es elevado, la actividad para inducir apoptosis de las células tumorales de NGR-L-TRAIL está aumentada significativamente. El dominio NGR de NGR-L-TRAIL puede dirigir la proteína de la variante de TRAIL a la superficie de la célula diana para su enriquecimiento sobre la superficie celular. El resultado de eso es el aumento de la concentración local de variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores, por tanto el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF que es una parte de la molécula variante puede acercarse al receptor de TRAIL fácilmente, de forma frecuente y eficaz de modo que la señal para activar las rutas de apoptosis se potencie y se aumente la actividad de NGR-L-TRAIL. Y además, la potenciación del aumento de la actividad para inducir la apoptosis depende de la abundancia de la expresión de CD13 sobre la superficie de las células tumorales, donde, cuanto mayor es la abundancia, mayor es la actividad, y viceversa. Por ejemplo, en las células tumorales Hela que expresan CD13 a alto nivel, a causa de la sobreexpresión de CD13, la actividad de NGR-L-TRAIL está aumentada en 8 veces (Figura 4). Por el contrario, la actividad de NGR-L-TRAIL está aumentada poco en células de cáncer de colon COLO-205 que expresaban CD13 a bajo nivel. Los resultados anteriores indican claramente que: el aumento de la actividad de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores resulta del direccionamiento de CNGRC.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40

Realización 5:

- 45 Detección de las actividades enzimáticas de Caspasa-8 y Caspasa-3

Se detectan las actividades enzimáticas de Caspasa-8 y Caspasa-3 por el kit de ensayo fluorométrico (Oncogene Company) de acuerdo con el método experimental proporcionado por la compañía. El valor de fluorescencia se detecta por lector de microplaca, donde, los parámetros fluorescentes son: 400 nm de longitud de onda de excitación y 505 nm de longitud de onda de emisión.

50

Diferente de las células tumorales, incluso las células endoteliales normales de prepucio humano, células renales 293T y hepatocitos cultivados primarios se tratan por la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores cuya concentración es 300 ng/ml durante 24 horas, no se encuentra citotoxicidad significativa. El resultado muestra que la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores puede distinguir las células normales de las células tumorales, e inducir las células tumorales a apoptosis, sin embargo es seguro para las células normales.

55

60 Detectamos la actividad de Caspasa-8 y Caspasa-3 en células Hela que están tratadas por ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y la variante dirigida a tumores del mismo, por fluorometría. En comparación con la misma dosificación de TRAIL, NGR-L-TRAIL muestra mayor actividad de Caspasa-8 y Caspasa-3 (Figura 5A, 5B). Indica que, como el dominio NGR de NGR-L-TRAIL puede dirigir la proteína variante de TRAIL a la superficie de las células diana para su enriquecimiento sobre la superficie de las células, la concentración local de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores aumenta. Por tanto, el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF que es una parte de la molécula variante puede acercarse más fácilmente, de forma

65

más frecuente y eficaz al receptor de TRAIL, para aumentar la señal para activar las rutas de apoptosis. En las células Jurkat mutadas de FADD^{-/-} y Caspasa-8^{-/-}, la inducción de apoptosis no puede detectarse cuando se usa ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y la variante del mismo. Indica que, el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, así como la variante el mismo, desempeña un papel en la inducción de la apoptosis mediante receptor-FADD-Caspasa-8.

Realización 6:

El experimento de efecto antitumoral en modelo animal de tumor

Los ratones desnudos hembra comprados del ShangHai Experiment Animal Center son de 5-6 semanas de edad. La inyección intravenosa en la cola del ratón de 100 µg de anticuerpo purificado Asialo GM-1 (Wako Chemicals Company, Japón) que es anticuerpo específico bloqueante de células citolíticas naturales se realiza primero. Después de 24 horas, se vacunan por vía subcutánea 100 mil células cancerígenas de colon COLO-205, HT-15 y HT-29 en el lado derecho superior del lomo de un ratón. Cuando el volumen de tumor llega a 70 milímetros cúbicos, los ratones se agrupan aleatoriamente y se tratan. El ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF recombinante y su variante dirigida NGR-TRAIL, y la proteína de la variante RGD-L-TRAIL se inyectan por vía intraperitoneal una vez al día y se continúa durante 10 a 14 días. Se administra camptotecina hidrosoluble CPT-11 (11-hidroxi-camptotecina, marca registrada: Campto, de Pharmacia/Upjohn Company) por administración intravenosa una vez a la semana, por dos veces en total. La proteína recombinante y camptotecina se diluyen por tampón fosfato. El volumen del tumor se detecta mediante calibre vernier y se calcula de acuerdo con la fórmula: la longitud se multiplica por el cuadrado de la anchura y después se divide por 2.

Se utilizan dos modelos de cáncer de colon de COLO-205 y HT-15 para detectar y comparar la actividad antitumoral del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y su variante dirigida a tumores NGR-L-TRAIL en ratones desnudos atímicos. A causa de la sensibilidad de las células de cáncer de colon COLO-205 y HCT-15 a TRAIL (donde COLO-205 es más sensible), evaluamos el efecto del tratamiento de NGR-L-TRAIL y TRAIL por separado en dos modelos. Como se muestra en las Figuras 4 y 6, NGR-L-TRAIL inhibía el crecimiento tumoral significativamente y la actividad inhibidora del crecimiento del tumor del mismo es mayor que la de TRAIL de tipo silvestre y RGD-L-TRAIL.

En el modelo COLO-205, la actividad inhibidora del crecimiento de tumores de dosificación de 100 µg/día de NGR-L-TRAIL es mucho mejor que la dosificación de 100 µg/día de TRAIL de tipo silvestre ($p < 0,01$); y la actividad inhibidora del crecimiento de tumores de la dosificación de 100 µg/día de NGR-L-TRAIL es mucho mejor que la dosificación de 100 µg/día de RGD-L-TRAIL ($p < 0,01$) ($p < 0,05$), e incluso la dosificación de NGR-L-TRAIL se recorta a 1/5 veces (20 µg/día) de la de tipo silvestre, la actividad inhibidora del crecimiento de tumores es mejor que la de TRAIL de tipo silvestre (100 µg/día) ($p < 0,05$); y la actividad inhibidora del crecimiento de tumores de la dosificación de 20 µg/día de NGR-L-TRAIL es casi la actividad inhibidora del crecimiento de tumores de la dosificación de 100 µg/día de RGD-L-TRAIL (Figura 6).

En el modelo HCT-15, la actividad inhibidora del crecimiento de tumores de NGR-L-TRAIL es mejor que TRAIL de tipo silvestre ($p < 0,01$), y mejor que RGD-L-TRAIL también ($p < 0,05$), a la misma dosificación (400 µg/día); y, cuando su dosificación se recorta a 1/5 veces (80 µg/día) de la dosificación de TRAIL de tipo silvestre, su actividad inhibidora del crecimiento de tumores es igual a la de TRAIL de tipo silvestre (400 µg/día) (no hay diferencia significativa entre ellos) (Figura 7). La actividad inhibidora del crecimiento de tumores de NGR-L-TRAIL de la dosificación de 80 µg/día es casi la actividad inhibidora del crecimiento de tumores de RGD-L-TRAIL de la dosificación de 400 µg/día. Durante el tratamiento, la actividad inhibidora del crecimiento de tumores de NGR-L-TRAIL depende de la dosificación.

Los resultados anteriores muestran que: la combinación de CNRC con TRAIL aumenta significativamente la actividad antitumoral de TRAIL, *in vivo*; además, el efecto antitumoral de NGR-L-TRAIL excede significativamente el de RGD-L-TRAIL.

El efecto antitumoral de TRAIL dirigido a tumores usado junto con el fármaco quimioterapéutico CPT-11 se investiga en la presente invención. A través de los modelos COLO-205, HC-15 y HT-29 de ratones desnudos atímicos, se investiga el efecto antitumoral de NGR-L-TRAIL usado junto con el fármaco quimioterapéutico CPT-11, donde, COLO-205, HC-15 son sensibles a TRAIL, y COLO-205 es el más sensible, y HT-29 es insensible a TRAIL. La proteína de NGR-L-TRAIL o TRAIL se inyecta por vía intraperitoneal una vez al día durante dos semanas, y se inyecta por vía intravenosa en la cola CPT-11 una vez cada dos días hasta 7 inyecciones. En el grupo de administración de combinación, para el modelo COLO-205 que es sensible a TRAIL, se administra una dosificación inferior de CDT-11 (6,25 mg/kg por vez) con dosificación diferente de NGR-L-TRAIL (30 u 80 µg/día por ratón) o TRAIL (270 µg/día por ratón o 90 µg/día por ratón); para el modelo de cáncer de colon HT-29 que es insensible a TRAIL se administra una dosificación mayor de CPT (25 mg/kg por vez) con NGR-L-TRAIL o TRAIL (400 µg/día por ratón).

En el modelo COLO-205, la actividad inhibidora del crecimiento de tumores del grupo en que se administra NGR-L-TRAIL cuya dosificación es 30 µg/día en combinación con CPT-11 cuya dosificación es 6,25 mg/kg por vez es más

fuerte que la del grupo en que se administra NGR-L-TRAIL únicamente con la dosificación de 30 µg/día ($p < 0,05$); es igual a la del grupo en que se administra TRAIL cuya dosificación es 270 µg/día en combinación con CPT-11 cuya dosificación es 6,25 mg/kg por vez; y es más fuerte que la del grupo en que se administra TRAIL cuya dosificación es 90 µg/día en combinación con CPT-11 cuya dosificación es 6,25 mg/kg por vez ($p < 0,05$) (Figura 6).

En el modelo HCT-15, la actividad inhibitora del crecimiento de tumores del grupo en que se administra NGR-L-TRAIL cuya dosificación es 80 µg/día en combinación con CPT-11 cuya dosificación es 6,25 mg/kg por vez es más fuerte que la del grupo en que se administra únicamente CPT-11 cuya dosificación es 6,25 mg/kg por vez o NGR-L-TRAIL cuya dosificación es 80 µg/día; y es más fuerte que la del grupo en que se administra TRAIL cuya dosificación es 400 µg/día en combinación con CPT-11 cuya dosificación es 6,25 mg/kg por vez (Figura 7). Es notable mencionar que, en el grupo en que se administra NGR-L-TRAIL cuya dosificación es 400 µg/día por ratón en combinación con CPT-11, en el 28º día, hay 8 ratones con tumor desaparecido de los 10 ratones administrados; en el grupo en que se administra TRAIL cuya dosificación es 400 µg/día en combinación con CPT-11, en el 28º día, hay 7 ratones con tumor desaparecido de los 10 ratones administrados (Figura 7B).

En el modelo de cáncer de colon HT-29 insensible a TRAIL, cuando se usa únicamente NGR-L-TRAIL, incluso a la dosificación de inyección intraperitoneal de hasta 400 µg/día por ratón, solamente puede encontrarse un efecto antitumoral débil. Sin embargo, cuando se combina NGR-L-TRAIL con CPT-11 para el tratamiento, se inhibe el crecimiento del tumor significativamente, y el efecto es mejor que el de la combinación de TRAIL con CPT-11. Cuando se combinan NGR-L-TRAIL cuya dosificación es 400 µg/día con CPT-11 cuya dosificación es 25 mg/kg/día, la actividad inhibitora del crecimiento de tumores es mejor, y mucho mejor que el grupo en que se administra NGR-L-TRAIL a 400 µg/día ($p < 0,01$), y mejor que la del grupo en que la dosificación de CPT-11 es 25mg/kg/día ($p < 0,05$), y también, es mejor que la del grupo en que se administra TRAIL cuya dosificación es 400 µg/día en combinación con CPT-11 cuya dosificación es 25/mg/kg/día ($p < 0,05$).

Hablando en líneas generales, en los modelos de cáncer mencionados anteriormente, cuando se combinan con CPT-11, la actividad antitumoral de NGR-L-TRAIL es más fuerte que el efecto cuando se usa NGR-L-TRAIL o CPT-11 solamente, y el efecto de NGR-L-TRAIL en combinación con CPT-11 es mejor que el efecto de TRAIL en combinación con CPT-11. Cuando la dosificación de NGR-L-TRAIL es 1/9~1/3 y 1/5 de la dosificación de TRAIL por separado, cuya residencia afecta a tumor COLO-205 y HCT-15 que es sensible, es igual al efecto de TRAIL. Cuando se combinan NGR-L-TRAIL con CPT-11, cuya actividad inhibitora del crecimiento de tumor HT-29 que es insensible a TRAIL es mejor que la de la misma dosificación de TRAIL en combinación con CPT-11. Los resultados muestran que: cuando se combinan con CPT-11, la actividad antitumoral de la proteína variante dirigida a tumores NGR-L-TRAIL está significativamente mejorada en comparación con cuando se usa en solitario, y la actividad inhibitora del crecimiento de tumores es mejor que la combinación de TRAIL de tipo silvestre con fármacos quimioterapéuticos. Además, la combinación amplía el alcance de su aplicación. La proteína variante dirigida a tumores puede inhibir de forma eficaz el crecimiento de tumores que son insensibles a TRAIL (tales como cáncer de colon HT-29).

Los experimentos en modelos animales *in vivo* demuestran el mejor efecto de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores NGR-L-TRAIL que el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF de tipo silvestre, y la variante RGF-L-TRAIL de TRAIL dirigida a integrina $\alpha\beta3$ e integrina $\alpha\beta5$. Indican que, cuando se combinan con péptido dirigido a tumores dirigido a CD13, el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF puede aumentar la actividad biológica antitumoral a nivel de modelo animal de tumor. Asimismo, la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF no solamente aumenta el efecto cuando se usa en solitario, sino que también tiene efecto más significativo cuando se combina con fármacos quimioterapéuticos a causa del significativo efecto sinérgico. La combinación de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF con CPT-11 no solamente puede disminuir su dosificación, minimizar la toxicidad sistémica potencial, sino también puede ampliar el alcance de aplicación a tumores que son insensibles al ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF originalmente (Figura 8). Los experimentos en animales *in vivo* demuestran que el efecto del tratamiento de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores es preferido que el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, incluso que la variante RGF-L-TRAIL de TRAIL dirigida a integrina $\alpha\beta3$ e integrina $\alpha\beta5$.

Realización 7:

El ensayo de distribución de fármaco de proteína recombinante en tejido tumoral

Se marca por separado la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF recombinante NGR-L-TRAIL, y la variante RGD-L-TRAIL por el kit marcado por el radioisótopo ^{125}I . Los resultados del experimento de marcaje son que: la actividad específica de ^{125}I -ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF es 7,86 µCi por un µg de proteína, y la actividad específica de ^{125}I -variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF es 7,49 µCi por un µg de proteína. Después de implantar el tumor de colon COLO-205, los ratones desnudos se asignan aleatoriamente para el grupo de tipo silvestre y dos grupos de variante cuando el volumen del tumor es de hasta 400 a 500 milímetros cúbicos. Se establecen 5 puntos temporales, que son 5, 30, 60, 120 y 240 minutos por separado. En cada punto temporal, se seleccionan 3 animales, y se inyectan 5 µCi de proteína marcada para cada ratón desnudo que alberga tumor. En cada punto temporal, el tejido tumoral se enuclea por operación quirúrgica del

ratón y se pesa. La dosis radiológica se detecta por recuento de centelleo líquido. La abundancia de proteína marcada en tejido tumoral se calcula por el porcentaje de la dosis radiológica detectada por gramo del tejido para la dosis radiológica de inyección (% ID/g).

5 Para demostrar adicionalmente que el aumento de la actividad antitumoral de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF en modelo animal resulta de su enriquecimiento en tejido tumoral, y para comparar la capacidad de direccionamiento de NGR-L-TRAIL y RGD-L-TRAIL en modelo animal de tumor, se detectan las distribuciones de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF NGR-L-TRAIL y RGD-L-TRAIL marcados por isótopo ¹²⁵I, y TRAIL de tipo silvestre en tejido tumoral. El ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y la variante del mismo marcados por la misma dosis radiológica de ¹²⁵I se inyectan en ratones desnudos que albergan tumor COLO-205 por separado. Después de 5, 30, 60, 120 minutos después de la inyección, se enuclean los tejidos tumorales de los ratones por operación quirúrgica y se pesan. Las dosis radiológicas del isótopo se detectan por recuento de centelleo líquido por separado. Los resultados muestran que: cuando el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF TRAIL se combina con el péptido corto de ligando CNGRC de CD13, y el péptido corto de ligando ACDCRGDCFC de integrina α V β 3 e integrina α V β 5, se aumenta significativamente la capacidad de enriquecimiento de la diana de la proteína TRAIL en tejidos tumorales COLO-205 y NGR-L-TRAIL puede existir y enriquecerse específicamente en tejidos tumorales. Justo después de la inyección, la abundancia de ¹²⁵I-RGD-L-TRAIL es aproximadamente 2 veces tanto como la de ¹²⁵I-TRAIL en tejido tumoral, y la abundancia de ¹²⁵I-NGR-L-TRAIL es aproximadamente 2,5 veces tanto como la de ¹²⁵I-TRAIL en tejido tumoral, y la abundancia de ¹²⁵I-NGR-L-TRAIL en tejido tumoral COLO-205 es significativamente mayor que la de ¹²⁵I-TRAIL (Figura 9). A causa del aumento de la afinidad de NGR-L-TRAIL y RGD-L-TRAIL por tejidos tumorales y la distribución expandida en tejidos tumorales, su tasa para retirarse en sangre en circulación se ralentiza enormemente, de modo que su tiempo de distribución se prolonga. Después de 240 minutos desde la inyección, es difícil encontrar la distribución de TRAIL en tejido tumoral, pero aún hay bastante de la distribución de RGD-L-TRAIL en la región tumoral (Figura 9), y el contenido de NGR-L-TRAIL en tejidos tumorales es dos veces tanto como el contenido de RGD-L-TRAIL. Los resultados anteriores muestran que, cuando se combina con TRAIL, el péptido CNGRC retiene la función biológica del péptido CNGRC de unirse a células endoteliales vasculares, y de inhibir su hiperplasia y de inducir la apoptosis. Por tanto, ambos hechos del aumento de la distribución en tejidos tumorales y de la actividad antitumoral detectada en modelos animales de la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF demuestran que la variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF NGR-L-TRAIL proporcionada por la presente invención puede dar capacidad de direccionamiento a tumor mejor y más fuerte del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF que TGD-L-TRAIL, y puede disminuir la dosis de administración, y finalmente puede mejorar el efecto antitumoral. Es el primero en mejorar el ligando de CD13, cuya capacidad de direccionamiento es preferida que ligandos RGD de integrinas que se usa para diagnóstico prematuro de tumor, es una sonda preferida para el diagnóstico de tumor en la presente invención.

Realización 8:

Unión de la proteína recombinante y tejido tumoral *in vivo*

40 El ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF y la variante dirigida a tumores NGR-L-TRAIL, RGD-L-TRAIL, albúmina sérica bovina se marcan por fluoresceína verde. La fluoresceína nómada se retira por tamiz molecular en gel Sephadex-G25 de la proteína marcada. Se inyectan 500 μ g de proteína marcada por fluoresceína verde en el ratón desnudo que alberga tumor cuando el volumen del tejido tumoral es de hasta 400 a 500 milímetros cúbicos por inyección en la vena de la cola. Después de 30 minutos desde la inyección, el tejido tumoral del ratón se enuclea por operación quirúrgica para preparar la suspensión de células individuales de las células tumorales. Después de lavar por solución salina fisiológica varias veces, se seleccionan 60 mil células para detectarse por citometría de flujo para analizar la unión de la proteína recombinante a la superficie de las células tumorales.

50 El análisis estadístico de los datos se realiza por el software de Statistical Package for the Social Science. Todos los experimentos se repiten al menos 3 veces. Los resultados de la inducción de apoptosis y los experimentos de adhesión se presentan por desviación típica promedio, y el volumen del tumor se presenta por error típico. Cuando p es menor de 0,05, se considera diferencia de significación; y cuando p es menor de 0,01, se considera diferencia de significación extrema, marcadas por uno o dos asteriscos por separado.

55 La distribución de NGR-L-TRAIL en otros tejidos es similar a TRAIL, y no existe enriquecimiento de especificidad en otros órganos viscerales (Figura 10A, Figura 10B). El metabolito de NGR-L-TRAIL *in vivo* se elimina del cuerpo por el riñón principalmente (Figura 10B).

60 Por tanto, el aumento de la distribución en la región tumoral en el cuerpo de animales y el aumento de la actividad antitumoral que se detecta en modelos animales demuestra completamente que NGR-L-TRAIL diseñado por nuestro diseño molecular es superior a RGD-L-TRAIL, y puede dar capacidad de direccionamiento preferida a la proteína TRAIL y finalmente puede aumentar el efecto antitumoral.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una variante de un ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) dirigido a tumores que es una proteína de fusión que consiste en un segmento peptídico de un ligando de CD13, un péptido de conexión, y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), en la que el segmento peptídico del ligando de CD13 es el péptido CNGRC con una estructura de anillo.
- 10 2. Una variante de TRAIL de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cantidad de residuos de aminoácidos en el péptido de conexión es entre 1 y 25.
3. Una variante de TRAIL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que está modificada por una acidulación con polietilenglicol y ácido graso, y por una recombinación para añadir el fragmento Fc de un anticuerpo o albúmina.
- 15 4. Un método para preparar una variante de TRAIL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende:
- 20 la expresión por ingeniería genética y separación y purificación realizando el método de ingeniería genética rutinario del gen codificante de una variante del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF dirigido a tumores estructurado por síntesis artificial o clonación génica.
- 25 5. Un método para la expresión soluble de la variante de TRAIL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en *Escherichia coli*, en el que la cepa bacteriana recombinante de *Escherichia coli* que expresa la variante de TRAIL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 se cultiva e induce a la expresión a baja temperatura, en el que la baja temperatura es 35 °C-10 °C.
- 30 6. Un método para separar y purificar la variante de TRAIL, en el que la variante de TRAIL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 se purifica por cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad por metales.
- 35 7. Un ADNc que codifica la variante de TRAIL de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende secuencias continuas que codifican un ligando de CD13 y un péptido de conexión.
8. Un vector de terapia génica que comprende el ADNc de acuerdo con la reivindicación 7.
9. La variante de TRAIL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en terapia tumoral.
- 40 10. La variante de TRAIL de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en terapia tumoral en combinación con los fármacos y tecnologías existentes para terapia tumoral.
- 45 11. El ADNc de acuerdo con la reivindicación 7 o el vector de terapia génica de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso en terapia tumoral.
12. El ADNc de acuerdo con la reivindicación 7 o el vector de terapia génica de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso en terapia tumoral en combinación con los fármacos y tecnologías existentes para terapia tumoral.

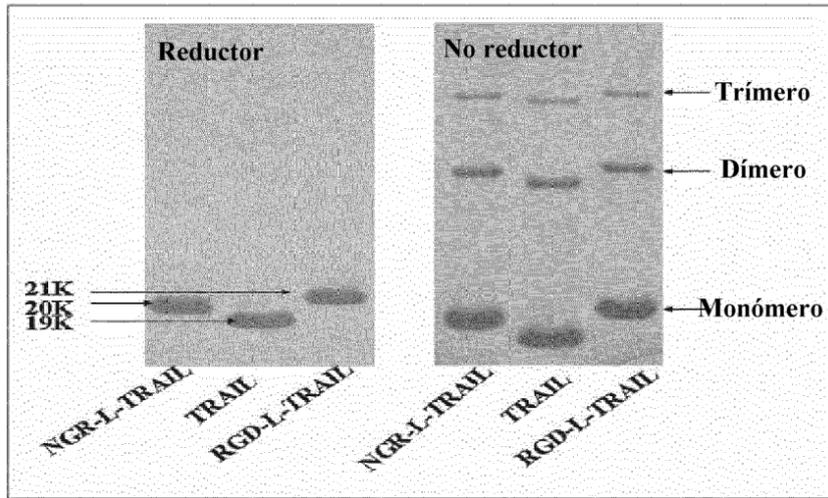


Figura 1

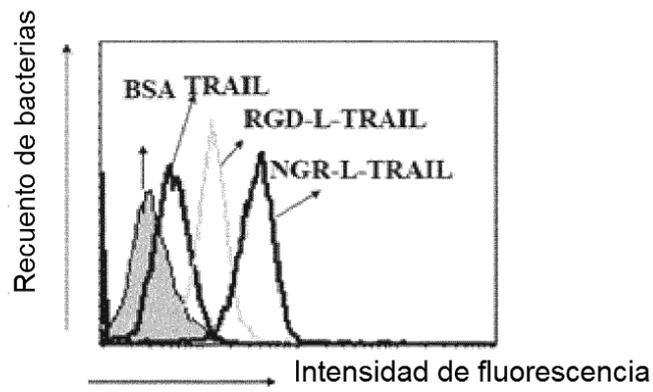


Figura 2

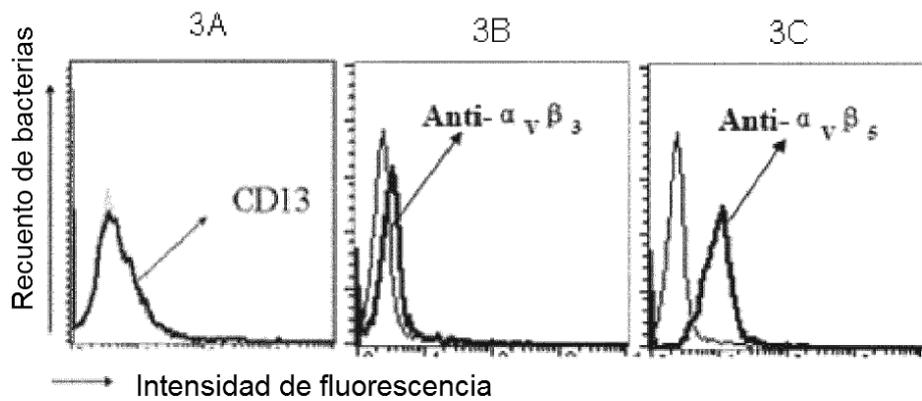


Figura 3

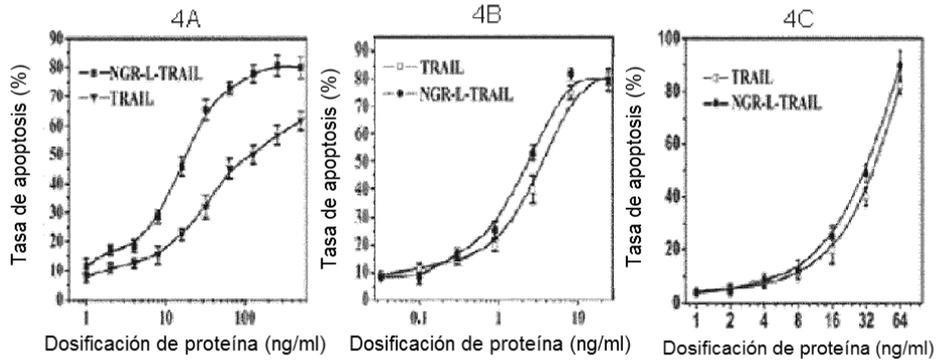


Figura 4

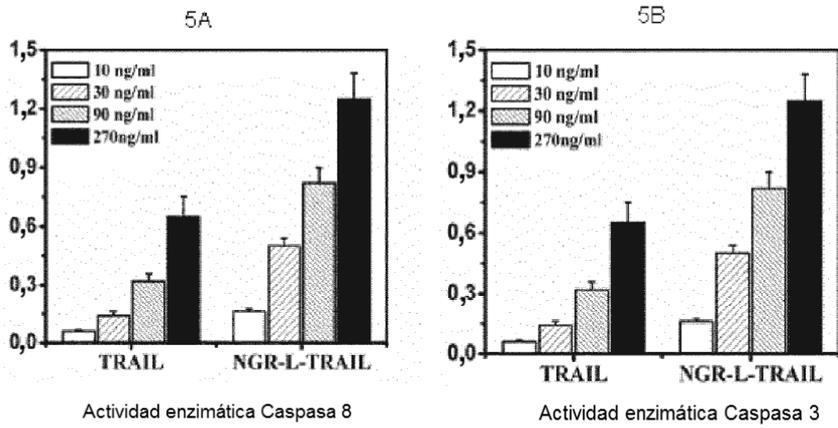


Figura 5

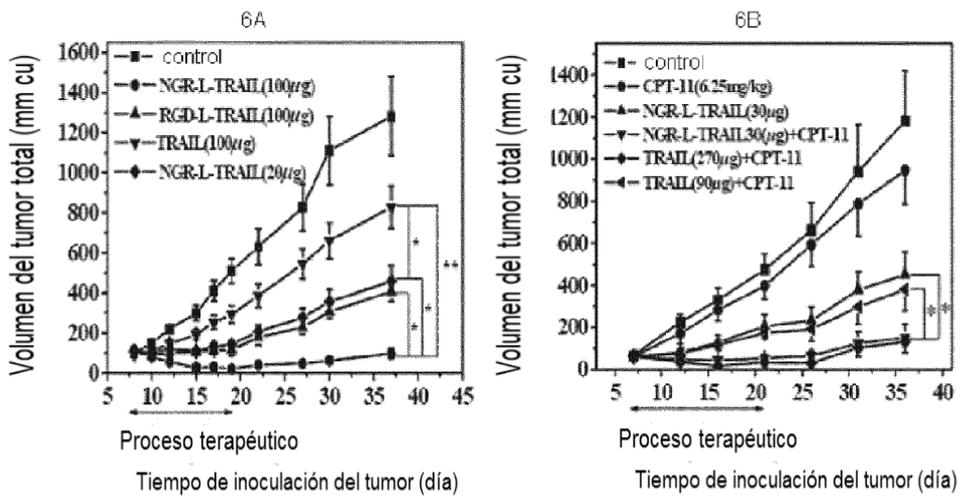


Figura 6

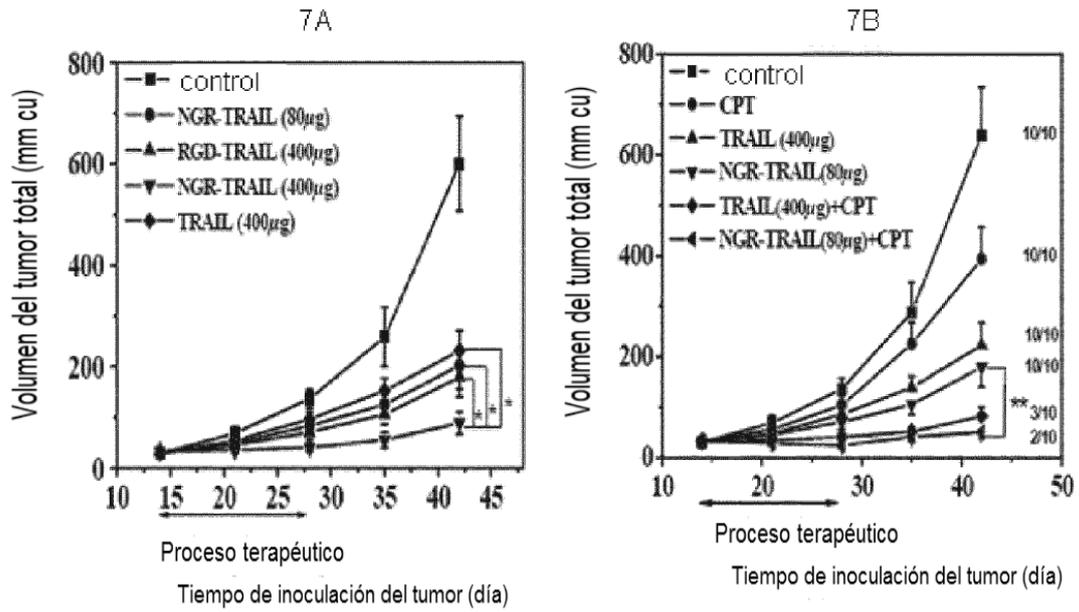


Figura 7

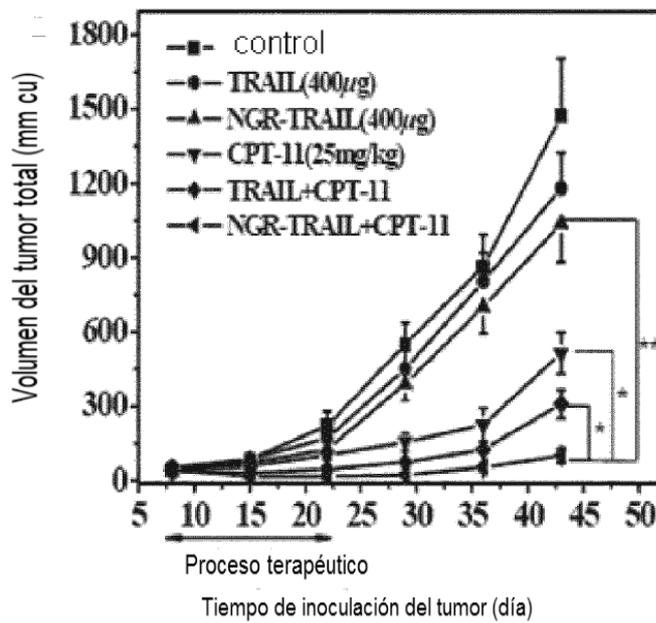


Figura 8

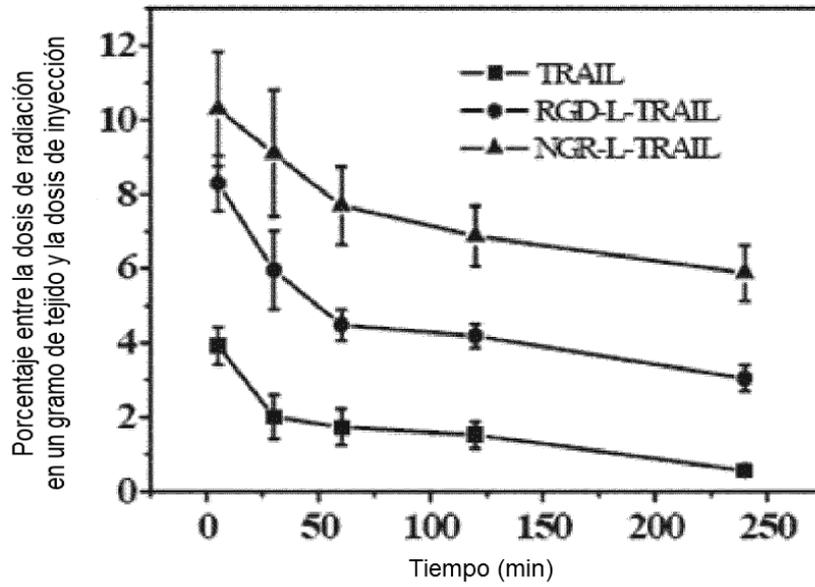


Figura 9

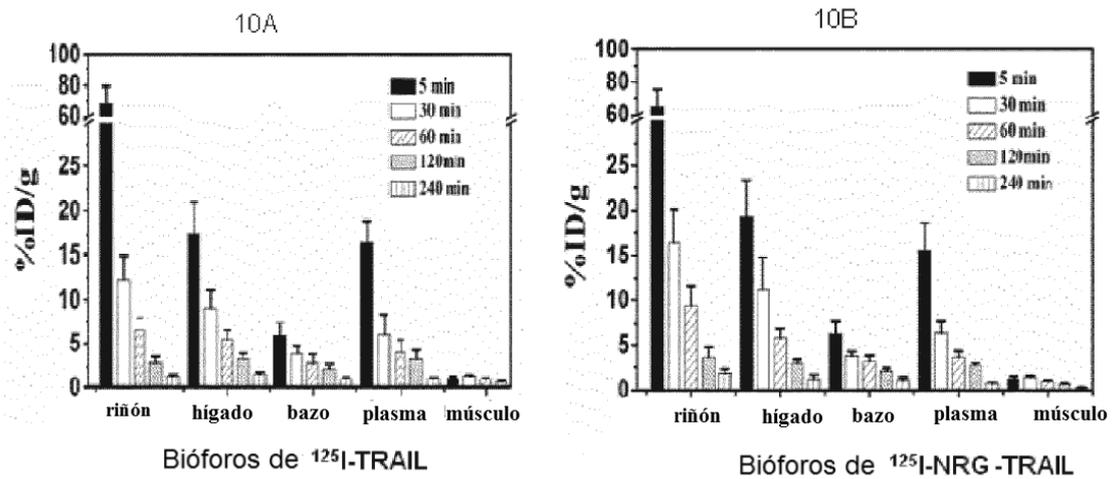


Figura 10