

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/020933 A2

(43) Fecha de publicación internacional
24 de febrero de 2011 (24.02.2011)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin [ES/ES]; Barrio Sarriena s/n, E-48940 Leioa (Vizcaya) clasificar (ES).
- (21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES2010/000354 (74) Mandatario: BELTRÁN BLÁZQUEZ, José Ramón; C/ Pedro Cerbuna, 12, E-50009 Zaragoza (ES).
- (22) Fecha de presentación internacional: 12 de agosto de 2010 (12.08.2010) (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad: P200930618 21 de agosto de 2009 (21.08.2009) ES (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): ANEL BERNAL, Luis Alberto [ES/ES]; C/ Pedro Cerbuna, 12, E-50009 Zaragoza (ES). MARTÍNEZ LORENZO, María José [ES/ES]; C/ Pedro Cerbuna, 12, E-50009 Zaragoza (ES). MARTÍNEZ LOSTAO, Luis [ES/ES]; C/ Pedro Cerbuna, 12, E-50009 Zaragoza (ES). ÁLAVA MARTÍNEZ DE CONTRASTA, María Ángeles [ES/ES]; C/ Pedro Cerbuna, 12, E-50009 Zaragoza (ES). LARRAD MUR, Luis [ES/ES]; C/ Pedro Cerbuna, 12, E-50009 Zaragoza (ES). NAVAL IRABERRI, Javier [ES/ES]; C/ Pedro Cerbuna, 12, E-50009 Zaragoza (ES). PIÑEIRO ANTÓN, Andrés [ES/ES]; C/ Pedro Cerbuna, 12, E-50009 Zaragoza (ES). BASAÑEZ ASUA, Gorka
- Publicada:
- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))
 - con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: LIPOSOMES COVERED WITH THE EXTRACELLULAR DOMAIN OF THE APO2L/TRAIL PROTEIN

(54) Título : LIPOSOMAS RECUBIERTOS CON EL DOMINIO EXTRACELULAR DE LA PROTEÍNA APO2L/TRAIL

(57) Abstract: The invention relates to the field of biotechnology and medicine. The invention specifically relates to a compound comprising a liposome covered or decorated at least with the extracellular domain of the APO2L/TRAIL protein, and to the use thereof for developing a medicament preferably for the treatment of a cancer or inflammatory or autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis.

(57) Resumen: La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología y la medicina. Específicamente, la presente invención se refiere a un compuesto que comprende un liposoma recubierto o decorado, al menos, con el dominio extracelular de la proteína APO2L/TRAIL y a su uso para la elaboración de un medicamento, preferiblemente, para el tratamiento de un cáncer o de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, como la artritis reumatoide.



WO 2011/020933 A2

Liposomas recubiertos con el dominio extracelular de la proteína APO2L/TRAIL

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología y la medicina. Específicamente, la presente invención se refiere a un compuesto que comprende un liposoma recubierto o decorado, al menos, con el dominio extracelular de la proteína APO2L/TRAIL y a su uso para la elaboración de un medicamento, preferiblemente, para el tratamiento de un cáncer o de
10 enfermedades inflamatorias o autoinmunes, como la artritis reumatoide.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

APO2L/TRAIL es una proteína de la familia del TNF (Tumor Necrosis Factor)
15 que actúa como ligando mortal induciendo la muerte celular al activar la vía extrínseca de la apoptosis (Pitti et al. 1996. J Biol Chem 271: 12687-90; Wiley et al. 1995. Immunity 3: 673-82). APO2L/TRAIL es capaz de inducir la apoptosis de las células tumorales sin afectar a las células normales. Esta observación ha propiciado que la vía de señalización de esta molécula tenga
20 un gran potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer (Mitsiades et al. 2001. Blood 98: 795-804; Marini et al. 2006. Oncogene 25: 5145-54; Mitsiades et al. 2001. Expert Opin Investig Drugs 10: 1521-30; Duiker et al. 2006. Eur J Cancer 42: 2233-40; Daniel et al. 2007. Blood 110: 4037-46; Xu et al. 2003. World J Gastroenterol 9: 1241-5). El uso de diversas formas recombinantes de
25 APO2L/TRAIL en ensayos preclínicos para inducir la apoptosis de células tumorales, bien en monoterapia, bien en combinación con otras terapias, ha sido descrito en las solicitudes de patente con número de publicación EP1957529, US6444640, CA2544923, WO9701633, WO02069995 o WO03028001. De hecho, su uso para el tratamiento de diversas neoplasias
30 malignas se está evaluando actualmente en diversos ensayos clínicos (Johnstone et al. Nat Rev Cancer. 2008 Oct; 8:782-98).

APO2L/TRAIL también ha sido implicado en el proceso denominado muerte celular inducida por activación (AICD, del inglés, *Activation Induced Cell Death*) mediante el cual los linfocitos T activados que se generan durante una respuesta inmune son eliminados para recuperar la homeostasis (Anel et al. 5 2007. *Front Biosci* 12: 2074-84; Bosque et al. 2008. *J Leukoc Biol* 84:488-98; Bosque et al. 2005. *J Leukoc Biol* 77: 568-78; Bosque A et al. 2005 *Eur J Immunol* 35: 1812-21; Martinez-Lorenzo et al. 1998. *Eur J Immunol* 28: 2714-25). La implicación de APO2L/TRAIL en fenómenos de regulación del sistema inmune y en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes ha sido 10 corroborada en los estudios realizados en el ratón KO para APO2L/TRAIL (Lamhamedi-Cherradi et al. 2003. *Nat Immunol* 4: 255-60). La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad de base autoinmune en la que el sistema inmune ataca y destruye fundamentalmente las articulaciones. Se cree que una apoptosis defectiva podría contribuir a la perpetuación de los linfocitos T 15 activados presentes en el líquido sinovial, responsables de la destrucción articular característica de la AR. Por ejemplo, aunque los linfocitos T activados presentes en el líquido sinovial de pacientes con AR son sensibles a la muerte celular inducida por APO2L/TRAIL, parece existir en el líquido sinovial de estos 20 pacientes un defecto en la secreción de APO2L/TRAIL asociado a exosomas (Martinez-Lorenzo et al. 2007. *Clin Immunol* 122: 28-40). El uso de APO2L/TRAIL recombinante también puede ser una terapia efectiva para el tratamiento de la AR (Yao et al. 2006. *Arthritis Res Ther* 8: R16; solicitud de patente con número de publicación WO0122987).

25 Por otra parte, los liposomas son vesículas lipídicas utilizadas como sistemas de almacén o de transporte de fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades como, por ejemplo, el cáncer o la AR. La unión de ligandos a la superficie de los liposomas que favorezcan la vectorización de los liposomas hacia células diana también es conocida (Samad et al. 2007. *Curr Drug Deliv* 4: 30 297-305; Schwendener. 2007. *Adv Exp Med Biol* 620: 117-28; Metselaar et al. 2004. *Ann Rheum Dis* 63: 348-53; Ceponis et al. 2001. *Arthritis Rheum* 44: 1908-16; Trif et al. 2007. *J Liposome Res* 17: 237-48).

Por tanto, el uso de APO2L/TRAIL recombinante es una aproximación terapéutica útil en el tratamiento del cáncer, así como de enfermedades inflamatorias o autoinmunes como, por ejemplo, la AR. No obstante, el desarrollo de compuestos que potencien su actividad terapéutica y/o disminuir la dosis terapéutica necesaria permitiría mejorar significativamente la eficacia del tratamiento y/o la calidad de vida de los pacientes.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere a un compuesto que comprende un liposoma recubierto o decorado, al menos, con el dominio extracelular de la proteína APO2L/TRAIL y a su uso para la elaboración de un medicamento, preferiblemente, para el tratamiento de un cáncer o de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, como la artritis reumatoide.

15 Los autores de la presente invención han generado liposomas artificiales de características similares a las de los exosomas naturales secretados por las células en lo que se refiere a su composición lipídica y tamaño, a los cuales se les ha incorporado la proteína APO2L/TRAIL bioactiva en su superficie (LUV-
20 APO2L/TRAIL).

En estudios de citotoxicidad realizados *in vitro* sobre distintas líneas celulares tumorales se ha podido comprobar que la capacidad de inducir muerte celular es mayor con LUV-APO2L/TRAIL que con APO2L/TRAIL soluble.
25 Concretamente, la concentración inhibitoria media es unas 5 veces menor en el caso de los liposomas decorados con APO2L/TRAIL respecto a la proteína soluble como media de las líneas celulares tumorales analizadas.

Por otra parte, utilizando un modelo animal de artritis inducida por antígeno (AIA) se ha demostrado que la inyección intra-articular de LUV-APO2L/TRAIL
30 es capaz de reducir la inflamación de las articulaciones afectadas de artritis de manera más eficaz que cuando se inyecta la proteína APO2L/TRAIL soluble.

APO2L/TRAIL es una proteína transmembrana de tipo II perteneciente a la superfamilia del TNF. La proteína APO2L/TRAIL de *Homo sapiens* tiene 281 aminoácidos y su número de acceso del *Genebank* es NP003801.1 (SEQ ID: 3). Consta de un dominio intracelular (aminoácidos 1-17), un dominio transmembrana (aminoácidos 18-38) y un dominio extracelular (aminoácidos 39-281; SEQ ID: 2). Este dominio extracelular puede ser liberado al medio, pudiendo así aparecer de forma soluble. Se han generado varias proteínas recombinantes de APO2/TRAIL soluble con diferentes tamaños, que contienen, por ejemplo, los aminoácidos 91-281, 95-281 ó 114-281 (SEQ ID: 1). Estas proteínas recombinantes se han empleado para estudiar la relación entre la estructura y la función de APO2L/TRAIL. Además, estas proteínas recombinantes de APO2/TRAIL solubles están siendo comercializadas por diferentes casas comerciales como, por ejemplo, Calbiochem® con número de catálogo 616376, Bender MedSystems® con número de catálogo BMS356, Preprotech® con número de catálogo 310-4, Biovisión, Inc. con número de catálogo 4354-50, Cell Sciences® con número de catálogo CRT500 o Chemicon® GF092.

Un primer aspecto de la presente invención, que de ahora en adelante denominaremos "composición de la invención", se refiere a un compuesto que comprende un liposoma recubierto o "decorado", al menos, con la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID: 2 o cualquiera de sus variantes o porciones de las mismas biológicamente activas,

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "variante" se refiere a una proteína sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente a la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID: 2. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos que no alteren sustancialmente su función. El término "variante" incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación o fosforilación.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es "sustancialmente homóloga" a la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID: 2, cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID: 2, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID:2, de, al menos, un 60%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferentemente de, al menos un 90%, más preferentemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferentemente de, al menos, un 99%. Las secuencias homologas a la secuencia de la SEQ ID: 2 pueden ser identificadas fácilmente por un experto en la materia con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

Los términos "biológicamente activa" o "funcionalmente equivalente", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a cualquier variante de la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID: 2, a cualquier porción de la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID: 2 o a cualquier porción de una variante de la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID: 2 que, bien de manera soluble, bien formando parte de la composición de la invención, mantiene su función relacionada con la capacidad de inducir apoptosis. Algunos métodos de análisis de la apoptosis son, por ejemplo, pero sin limitarse, análisis morfológico de la condensación y/o fragmentación de la cromatina y los cuerpos apoptóticos, ensayos de detección de la fragmentación del DNA, análisis de proteasas inducidas por apoptosis (PARP o caspasa 3), métodos basados en la tinción del DNA (DAPI o ioduro de propicio), análisis de alteraciones de membrana (Anexina V), análisis de la capacidad celular para reducir MTT, técnicas de marcaje in situ (TUNEL o ISEL) o detección de proteínas relacionadas con la apoptosis (Fas, Apo-1, CD59 o p53). Por ejemplo, la capacidad de inducir apoptosis se puede determinar mediante métodos convencionales tales como los ensayos descritos en los Ejemplos que acompañan a esta descripción.

El término "porción" se refiere a un fragmento de la proteína de secuencia

aminoacídica SEQ ID: 2 o a un fragmento de una variante de la misma. En una realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto que comprende un liposoma recubierto o "decorado", al menos, con una porción biológicamente activa de la proteína que presenta una identidad de, al menos, un 80% con la SEQ ID NO: 1, preferiblemente de, al menos, un 90%, más preferiblemente de, al menos, un 95% y de, aún más preferiblemente, un 100%. Las secuencias homologas a la secuencia de la SEQ ID: 1 pueden ser identificadas fácilmente por un experto en la materia con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

10

Por tanto, los términos "liposoma decorado o recubierto con el dominio extracelular de la proteína APO2L/TRAIL" o "liposoma decorado o recubierto con la proteína APO2L/TRAIL" o "liposoma decorado o recubierto con APO2L/TRAIL", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere, a un liposoma que presenta unido a su superficie la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID: 2, cualquiera de sus variantes o porciones de las mismas biológicamente activas. Preferiblemente, dichos términos se refieren a una porción biológicamente activa de la proteína que presenta una identidad de, al menos, un 80% con la SEQ ID NO: 1, más preferiblemente de, al menos, un 90%, aún más preferiblemente de, al menos, un 95% y de, todavía aún más preferiblemente, un 100%.

15
20

Los liposomas son vesículas huecas que encapsulan parte del disolvente en el que se han preparado y cuya membrana esta formada por una o varias bicapas lipídicas. Han sido utilizados como sistemas de almacén o de transporte de fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades como, por ejemplo, el cáncer o la AR. Sin embargo, en la presente invención se describe el uso terapéutico de los liposomas con una molécula anclada en su exterior con el fin de potenciar la bioactividad (en este caso aumentar la capacidad citotóxica) de la proteína APO2L/TRAIL, que actúa como ligando mortal induciendo la apoptosis de las células diana). De este modo, el propio liposoma decorado

25
30

con la proteína APO2L/TRAIL se convierte en el tratamiento *per se* y no en un simple reservorio o modo de transporte del fármaco.

5 Los liposomas se pueden clasificar en función de su estructura y de su tamaño (Vance y Vance, 1996). Los liposomas multilaminares grandes (MLV) están formados por más de una bicapa, dispuestas en forma concéntrica y separadas entre sí por amplios espacios acuosos. Los liposomas unilaminares, en cambio, están formados por una única bicapa; se pueden clasificar asimismo según su tamaño en: liposomas unilaminares pequeños (SUV), cuando presentan un
10 diámetro medio entre 25 y 40 nm, y liposomas unilaminares grandes (LUV), cuando presentan un diámetro medio entre 40 y 500 nm. Preferiblemente, la presente invención se refiere a un compuesto que comprende un LUV con un diámetro de entre 100 nm y 200 nm.

15 Los liposomas se forman predominantemente a partir de compuestos anfifílicos, es decir, compuestos que se caracterizan por tener tanto un grupo hidrofílico (soluble en agua) como uno hidrofóbico (insoluble en agua) en la misma molécula. Los componentes estructurales más importantes de los liposomas son los fosfolípidos. Las propiedades de las vesículas liposomales van a depender, entre otros factores, de la naturaleza de los fosfolípidos
20 constituyentes, de determinadas características tales como la carga de su grupo polar y/o la longitud y el grado de saturación de las cadenas de sus ácidos grasos. Algunos ejemplos de fosfolípidos usados son: fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas, fosfatidilgliceroles, fosfatidilinositoles, 25 ácidos fosfatídicos o esfingomielinas. Preferiblemente, la presente invención se refiere a un compuesto que comprende un liposoma formado por, al menos, un fosfolípido seleccionado de entre: fosfatidilcolina y/o esfingomielina.

Además de los fosfolípidos, otros lípidos pueden formar parte de la
30 composición de los liposomas. Pueden formar parte de los liposomas esteroides como, por ejemplo, pero sin limitarse, el colesterol o los ácidos biliares; esfingolípidos como, por ejemplo, pero sin limitarse, gangliósidos o

cerebrósidos; o lípidos quelantes. Preferiblemente, la presente invención se refiere a un compuesto que comprende un liposoma que comprende, al menos, un fosfolípido seleccionado de entre: fosfatidilcolina y/o esfingomiélin, y que comprende, además, un estero. Preferiblemente, el estero es el coestero.

5

Los liposomas pueden ser preparados mediante numerosos procedimientos conocidos en el estado de la técnica, como, por ejemplo, pero sin limitarse sonicación, extrusión, utilización de ciclos de congelación-descongelación o utilización de surfactantes.

10

La presente invención se refiere a un compuesto que comprende un liposoma recubierto con la proteína APO2L/TRAIL. La porción soluble de la proteína APO2L/TRAIL puede estar unida directamente a los lípidos que constituyen el liposoma o a través de otra molécula que se encuentre integrada en el liposoma. Esta unión puede ser covalente, o mediante la formación de un compuesto de coordinación con un metal quelado. El metal puede estar quelado de tal manera que la unión mediante coordinación tenga lugar entre un grupo quelante presente en el liposoma y un grupo quelante presente en la proteína. Dichos grupos quelantes pueden ser partes quelantes de metales, como un lípido quelante de metales o una parte usada como una "etiqueta de afinidad por metales".

20

Los términos "parte quelante" o "grupo quelante de metales" incluyen cualquier parte capaz de formar un complejo de coordinación con un metal iónico. El término "lípido quelante de metales", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un lípido que comprende una parte o un grupo quelante de metales como, por ejemplo, pero sin limitarse, ácido nitrilo triacético (NTA). En principio, puede ser incorporado cualquier metal que tenga sitios de coordinación libres que puedan unirse con elementos donantes de electrones del grupo quelante de metales. El ión metálico puede ser un ión de un metal de transición, un ión de un lantánido o un ión de un actínido. El metal puede ser seleccionado del grupo que comprende, por ejemplo, pero sin

25

30

limitarse, cobre, níquel, zinc, hierro, cobalto, cadmio, manganeso o magnesio. Preferiblemente, el metal es níquel.

5 La expresión una "etiqueta de afinidad por metales", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una parte capaz de unirse mediante quelación a un ión metálico, e incluye, pero sin limitarse, secuencias aminoacídicas cortas, unidas a la proteína APO2L/TRAIL. La "etiqueta" puede ser adyacente al extremo amino-terminal de la proteína APO2L/TRAIL. Por ejemplo, pero sin limitarse, una "etiqueta de afinidad por el metal" común
10 consiste en varios residuos de histidina. El aumento del número de residuos capaces de unirse al metal generalmente aumenta la afinidad de la unión. La proteína APO2L/TRAIL con una "etiqueta de afinidad por el metal" puede ser obtenida mediante diferentes técnicas de generación de proteínas recombinantes conocidas en el estado de la técnica, y la proteína resultante
15 puede ser aislada y purificada mediante diferentes métodos conocidos en el estado de la técnica. Como consecuencia del proceso de generación de la proteína recombinante, ésta puede presentar una inserción de uno o más aminoácidos extra entre la etiqueta de afinidad y la porción soluble de la proteína APO2L/TRAIL.

20

Preferiblemente, la presente invención se refiere a un compuesto que comprende un liposoma recubierto, al menos, con la proteína APO2L/TRAIL que tiene unido en su extremo N-terminal, al menos, 6 histidinas, y preferiblemente, al menos 10 histidinas, donde el liposoma comprende además
25 un lípido quelante. Preferiblemente, el lípido quelante es 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-{succinil [ácido N-(5-amino-1-carboxilpentil)] iminodiacético iminodiacético} funcionalizado con níquel (DOGS-NTA-Ni).

Por tanto, el compuesto de la invención contiene, preferiblemente,
30 fosfatidilcolina, esfingomiélin, colesterol y DOGS-NTA-Ni, donde la proporción de DOGS con respecto al peso total de lípidos es de, al menos, el 1%, más preferiblemente de, al menos, el 2,5% y aún más preferiblemente, de al menos

el 5%. Siendo, por tanto, algunas composiciones válidas, por ejemplo, pero sin limitarse, 59%/30%/10%/1%, 57,5%/30%/10%/2,5% o 55%/30%/10%/5% de fosfatidilcolina, esfingomielina, colesterol y DOGS-NTA-Ni, respectivamente.

- 5 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del compuesto de la invención para la elaboración de un medicamento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del compuesto de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un cáncer. Los términos "tumor" o "tumoral", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a células transformadas que presentan un crecimiento incontrolado. Dependiendo de su posible evolución puede tratarse de un tumor benigno, que permanece en su lugar de inicio y no produce metástasis; o tumor maligno o cáncer, invasivo o que produce metástasis. Por tanto, el término "cáncer" o "canceroso" tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una alteración de las células tumorales que tienen capacidad de invadir tejidos o de producir metástasis en lugares distantes del tumor primario. Ejemplos de cáncer pueden ser, pero sin limitarse, de mama, de ovario, de útero, de cervix, de vagina, de vulva, de colon, de vejiga, de próstata, de piel, de pulmón, de hígado, de esófago, de estómago, de páncreas, de tracto urinario, de tiroides, de riñón, de cerebro, sarcoma, plasmocitoma, mieloma, linfoma o leucemia. Preferiblemente, la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un cáncer perteneciente al siguiente grupo: cáncer de pulmón, de colon, de riñón, plasmocitoma, mieloma, linfoma, o leucemia. Más preferiblemente, la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un cáncer perteneciente al siguiente grupo: cáncer de pulmón, plasmocitoma, mieloma, linfoma, o leucemia.

30

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el

tratamiento de las enfermedades inflamatorias o autoinmunes. El término “enfermedades inflamatorias” tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a aquellas en las que tienen lugar lesiones causadas por una reacción inmunitaria o una reacción inflamatoria del organismo. Algunos ejemplos de enfermedades inflamatorias son, por ejemplo, pero sin limitarse conjuntivitis, iritis, uveítis, retinitis, otitis, mastoiditis, rinitis, laberintitis, sinusitis, faringitis, tonsilitis, bronquitis, neumonía, bronconeumonía, pleuritis, mediastinitis, endocarditis, tromboflebitis, poliarteritis, nefritis, cistitis, estomatitis, esofaguitis, gastritis, colitis, apendicitis, hepatitis, colecistitis, pancreatitis, peritonitis, tiroiditis, dermatitis, encefalitis, meningitis, neuromielitis óptica, polineuritis, polimiositis, miositis osificante, osteoartritis o artritis reumatoide. Algunas enfermedades inflamatorias, como la artritis reumatoide, son trastornos de naturaleza autoinmune. Dentro del concepto “enfermedades autoinmunes” se engloban diferentes procesos patológicos que cursan con una respuesta inmunitaria contra el propio organismo. Ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen, pero sin limitarse, enfermedad de Crohn, anemia perniciosa, diabetes tipo I, enfermedad de Addison, enfermedad celíaca, enfermedad de Graves, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, síndrome de Reiter, síndrome de Sjogren, tiroiditis de Hashimoto, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, granulomatosis de Wegener, polimialgia reumática o artritis reumatoide. Preferiblemente, la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la artritis reumatoide.

25

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica comprende, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención y, además, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, otro principio activo.

- 5 Como se emplea aquí, el término "principio activo", "substancia activa", "substancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o
- 10 que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.
- Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su
- 15 administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en soluciones acuosas o no acuosas, en emulsiones o en suspensiones. Ejemplos de soluciones no acuosas son, por ejemplo, pero sin limitarse, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales,
- 20 tales como aceite de oliva, o ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Ejemplos de soluciones acuosas, son por ejemplo, pero sin limitarse, agua, soluciones alcohólicas en agua, o medios salinos. Las soluciones acuosas pueden estar tamponadas o no, y pueden tener componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para
- 25 modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, o similares, o nutrientes, incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero
- 30 sin limitarse a: aglutinantes, tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes, tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes, tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes, tales

como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes, tales como menta o salicilato de metilo.

5 Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intratecal, intraventricular, intraarticular, intratumoral, oral, enteral, parenteral, intranasal, ocular o tópica. Una vía de administración preferida de
10 las composiciones y/o formulaciones del compuesto de la invención para la prevención o el tratamiento de un cáncer es la vía intratumoral. Una vía de administración preferida de las composiciones y/o formulaciones del compuesto de la invención para la prevención o el tratamiento de la artritis reumatoide es la vía intraarticular.

15 La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia, del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto o de la composición farmacéutica de la invención que produzcan el
20 efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dicho compuesto o dicha composición farmacéutica y el efecto terapéutico a conseguir. Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos en el estado de la técnica.

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

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Muestra la expresión y purificación de APO2L/TRAIL recombinante. A. SDS-PAGE al 12 % y tinción de azul de Coomassie de los distintos pasos de expresión y purificación de APO2L/TRAIL-His₁₀: 1- E. Coli BL21-CodonPlus® (DE3)-RP transformadas sin IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactosido); 2- E. Coli BL21-CodonPlus® (DE3)-RP transformadas y tratadas 18 horas con 1mM IPTG; 3- Precipitado del extracto bacteriano diluido y dializado; 4- Extracto bacteriano diluido y dializado; 5- Sobrenadante del extracto tras incubar con la resina; 6- Lavado de la resina; 7- Eluido de la resina; 8- Marcadores de peso molecular. B. Western-blot de la fracción de elución de la resina revelado con el anticuerpo monoclonal Purified Mouse Anti-Human TRAIL, el anticuerpo monoclonal His-Tag® Monoclonal Antibody que reconoce la cola de histidinas incluida en el vector de expresión pET19b, y con un antisuero policlonal de conejo que reconoce APO2L/TRAIL generado previamente en nuestro laboratorio. Como control se ha revelado también la proteína recombinante APO2L.0 sin cola de histidinas (Genentech, San Diego, CA).

Figura 2. Muestra el análisis de la citotoxicidad de APO2L/TRAIL recombinante. La línea celular Jurkat clon E6.1 y la línea celular RPMI 8226 se incuban en ausencia (Control) o en presencia de 1.000 ng/mL o 100 ng/mL de APO2L/TRAIL-His₁₀ respectivamente. Tras 24 horas en ambas líneas celulares tumorales se observa la presencia de numerosas células de morfología típicamente apoptótica.

Figura 3. Muestra la unión de APO2L/TRAIL-His₁₀ a los LUVs con DOGS-NTA-Ni. Se han generado LUVs con una proporción de DOGS-NTA-Ni del 5, 2,5, 1 y 0% (p/p) que se han incubado con la proteína APO2L/TRAIL-His₁₀. Posteriormente se recolectan los LUVs-APO2L/TRAIL mediante ultracentrifugación y se realiza SDS-PAGE al 12% tomando alícuotas tanto de los pellets recolectados como de los sobrenadantes. El gel se tiñe con azul de Coomassie. 1- APO2L/TRAIL-His₁₀ sin incubar con LUVs; 2 y 3- Pellet y

sobrenadante de LUVs-APO2L/TRAIL con DOGS-NTA-Ni 5%; 4 y 5- Pellet y sobrenadante de LUVs-APO2L/TRAIL con DOGS-NTA-Ni 2,5%; 6 y 7- Pellet y sobrenadante de LUVs-APO2L/TRAIL con DOGS-NTA-Ni 1%; 8 y 9- Pellet y sobrenadante de LUVs-APO2L/TRAIL con DOGS-NTANi 0%. Stock:
5 APO2L/TRAIL-His₁₀; P: Pellet; S: Sobrenadante.

Figura 4. Muestra el análisis de la citotoxicidad de los LUVs-APO2L/TRAIL. La línea celular Jurkat clon E6-1 se incubó en presencia de 100 ng/mL de APO2L/TRAIL-His₁₀, de 100 ng/mL de LUVs 5% Ni-APO2L/TRAIL presentes en el pellet obtenido tras la ultracentrifugación, de 100 ng/mL del sobrenadante o de LUVs 5% control que no se han incubado con APO2L/TRAIL-His₁₀. Tras 24 horas se observa la presencia de numerosas células de morfología típicamente apoptótica cuando las células se han incubado con APO2L/TRAILHis₁₀ y con LUVs 5% Ni-APO2L/TRAIL presentes en el pellet. En el caso del sobrenadante o de los LUVs control, no se observa apoptosis de las células Jurkat.
10
15

Figura 5. Muestra el análisis de la citotoxicidad *in vitro* de los LUVs-APO2L/TRAIL en Jurkat clon E6.1. Se ha analizado la capacidad de inducir muerte celular en la línea celular tumoral Jurkat clon E6.1 tanto de APO2L/TRAIL soluble como de los LUVs-APO2L/TRAIL. El ensayo de citotoxicidad se ha realizado incubando las células con las dosis de 1.000, 500, 250, 100, 50, 25 y 10 ng/mL durante 24 horas. A. Análisis mediante citometría de flujo para valorar la presencia de células Anexina-V positivas. B. Análisis con tinción con azul de Tripán. C. Análisis con una variante del método de Mossman de reducción del MTT (dimetil-tiazolil-tetrazoilo). Los resultados obtenidos se muestran como la media \pm la desviación estándar de al menos dos experimentos.
20
25

Figura 6. Muestra el análisis de la citotoxicidad *in vitro* de los LUVs-APO2L/TRAIL en RPMI 8226. Se ha analizado la capacidad de inducir muerte celular en la línea celular tumoral RPMI 8226 tanto de APO2L/TRAIL soluble como de los LUVs-APO2L/TRAIL. El ensayo de citotoxicidad se ha realizado incubando las células con las dosis de 1.000, 500, 250, 100, 50, 25 y 10 ng/mL
30

durante 24 horas. A. Análisis mediante citometría de flujo para valorar la presencia de células Anexina-V positivas. B. Análisis con tinción con azul de Tripán. C. Análisis con una variante del método de Mossman de reducción del MTT. Los resultados obtenidos se muestran como la media \pm la desviación estándar de al menos dos experimentos.

Figura 7. Muestra el análisis de inhibición de la citotoxicidad *in vitro* con el anticuerpo bloqueante anti-APO2L/TRAIL 5C2. Se ha realizado un ensayo de citotoxicidad en ausencia o en presencia del anticuerpo bloqueante anti-APO2L/TRAIL 5C2. Se ha empleado una dosis de 5C2 de 100 ng/mL cuando se ha incubado en presencia de APO2L/TRAIL soluble o de 1.000 ng/mL cuando se ha incubado con LUVs-APO2L/TRAIL. A. Jurkat clon E6.1. B. RPMI 8226.

Figura 8. Muestra el análisis de citotoxicidad *in vitro* de los LUVs-APO2L/TRAIL en U266, IM-9, MM1.S, A549, U937 y U937-Bcl2 (proveniente de la línea parental U937 en la que se ha sobre-expresado la proteína anti-apoptótica Bcl2). Se ha analizado mediante citometría de flujo (células Anexina-V positivas) la capacidad de inducir muerte celular tanto de APO2L/TRAIL soluble como de los LUVs-APO2L/TRAIL. El ensayo de citotoxicidad se ha realizado incubando las células con las dosis de 1.000, 500, 100, 50 y 10 ng/mL durante 24 horas. A. Línea celular U266. B. Línea celular IM-9. C. Línea celular MM1.S. D. Línea celular A549. E. Línea celular U937. F. Línea celular U937-Bcl2.

25

Figura 9. Muestra el esquema temporal del protocolo empleado para la inducción de la AIA.

Figura 10. Muestra la inducción de la artritis inducida por antígeno (AIA) en conejos blancos New Zealand. A. La inyección i.a. con 5 mg de ovoalbúmina (OVA) induce correctamente la AIA en todas las rodillas de los 13 conejos blancos New Zealand (Grupo AIA). Tras 24 horas, se produce un aumento

30

significativo en el diámetro latero-lateral de las rodillas que se mantiene hasta el día del sacrificio. En los 6 conejos en los que la inyección i.a. se hace con PBS (Grupo Control), no se produce un aumento significativo del diámetro latero-lateral de las rodillas. *** $p < 0,001$. B. La AIA se produce de manera similar en ambas rodillas y en los 3 grupos de tratamiento. Los resultados obtenidos de la medición del diámetro latero-lateral de las rodillas se muestran como la media \pm la desviación estándar de los animales de cada grupo.

Figura 11. Muestra el peso de los conejos tras la inducción de la AIA. La AIA produce una pérdida de peso en el grupo de 13 conejos blancos New Zealand (Grupo AIA) a los que se les ha inducido la artritis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. En el grupo de 6 conejos blancos New Zealand a los que no se les induce la AIA (Grupo Control) no se observa descenso del peso en el momento del sacrificio. Los resultados obtenidos de la medición del peso se muestran como la media \pm la desviación estándar de los animales de cada grupo.

Figura 12. Muestra el análisis de la expresión del factor reumatoide tras la inducción de la AIA. La AIA produce un aumento del factor reumatoide (FR) en el grupo AIA de conejos blancos New Zealand a los que se les ha inducido la artritis respecto al grupo Control. ** $p < 0,01$. Los resultados obtenidos de la medición del FR se muestran como la media \pm la desviación estándar de los animales de cada grupo.

Figura 13. Muestra el efecto de los tratamientos (APO2L/TRAIL 5 μ g) en la AIA en los distintos grupos de conejos blancos New Zealand. El día del sacrificio se mide el diámetro latero-lateral de todas las rodillas de todos los conejos. A. Las barras indican la media \pm la desviación estándar de las rodillas no tratadas (**barras blancas**) y de las rodillas tratadas (**barras negras**) en el grupo 1 (APO2L/TRAIL), grupo 2 (LUVs-APO2L/TRAIL) y grupo 3 (LUVs). * $p < 0,05$. B. Las barras indican la media \pm la desviación estándar de las rodillas no tratadas (**barras blancas**) y de las rodillas tratadas (**barras negras**) en el grupo control 4-1 (APO2L/TRAIL), grupo 4-2 (LUVs-APO2L/TRAIL) y grupo 4-3 (LUVs).

Figura 14. Muestra el efecto de los tratamientos en la AIA en cada conejo blanco New Zealand. De cada conejo se calcula la diferencia entre el diámetro latero-lateral de su rodilla tratada y su rodilla no tratada y se expresa en milímetros (mm). Conejos del grupo 1 (**rombos negros**, APO2L/TRAIL), grupo 2 (**cuadrados negros**, LUVs-APO2L/TRAIL), grupo 3 (**triángulos negros**, LUVs) y grupo 4 (**círculos blancos**, control). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 15. Muestra la ausencia de efecto sistémico hepatotóxico de los tratamientos en los distintos grupos de conejos blancos New Zealand. A. Tras la inducción de la AIA se produce un aumento transitorio de los niveles de alaninoaminotransferasa (ALT) en el suero de los conejos del grupo AIA debido a la inducción de la artritis y no a la cola de histidinas de APO2L/TRAI-His₁₀. ** $p < 0,01$. B. Este aumento transitorio de la ALT se observa en los 3 grupos de tratamiento. En el grupo Control no se producen variaciones en los niveles séricos de ALT desde el inicio del experimento hasta el día del sacrificio. Los resultados obtenidos de la medición de la ALT se muestran como la media \pm la desviación estándar de los animales de cada grupo.

Figura 16. Muestra el efecto de los tratamientos (APO2L/TRAIL 10 μ g) en el diámetro latero-lateral de las rodillas en los distintos grupos de conejos blancos New Zealand. A. Experimento realizado en 10 conejos blancos New Zealand (Grupo 1, N=4; Grupo 2, N=4; Grupo 3, N=2). B. Experimento realizado en 13 conejos blancos New Zealand (Grupo 1, N=5; Grupo 2, N=5; Grupo 3, N=3). Las barras indican la media \pm la desviación estándar de las rodillas no tratadas (**barras blancas**) y de las rodillas tratadas (**barras blancas**) en el grupo 1 (APO2L/TRAIL), grupo 2 (LUVs-APO2L/TRAIL) y grupo 3 (LUVs). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Figura 17. Muestra el examen macroscópico de las rodillas en los distintos grupos de conejos blancos New Zealand. En la figura se muestra un ejemplo representativo de un conejo de cada grupo. A. Rodilla izquierda grupo 1 (no tratada). B. Rodilla derecha grupo 1 (tratada con APO2L/TRAIL). C. Rodilla

izquierda grupo 2 (no tratada). D. Rodilla derecha grupo 2 (tratada con LUVs-APO2L/TRAIL). E. Rodilla izquierda grupo 3 (no tratada). F. Rodilla derecha grupo 3 (tratada con LUVs). G. Rodilla izquierda grupo 4 (control, no tratada). H. Rodilla derecha grupo 4 (control, tratada con LUVs-APO2L/TRAIL). La flecha
5 negra indica la localización de la bolsa sinovial retro-patelar.

Figura 18. Muestra la valoración de los parámetros histopatológicos de las rodillas en los distintos grupos de conejos blancos New Zealand. Valoración de los 4 parámetros histológicos descritos por Sánchez-Pernaute O. y
10 colaboradores (Sanchez-Pernaute O. *et al.* Arthritis Rheum 1997; 40:2147–56) para la evaluación de la inflamación en el modelo de AIA en conejos blancos New Zealand. A. Infiltrado inflamatorio. B. Hiperplasia sinovial (número de capas de células sinoviales). C. Formación de villus. D. Aumento de la vascularización. En cada porta se ha examinado al microscopio óptico (20×) la
15 totalidad del tejido sinovial presente y el resultado se ha expresado como la media \pm la desviación estándar de todos los campos examinados para cada uno de los 4 parámetros.

Figura 19. Muestra el examen microscópico de las rodillas en los distintos
20 grupos de conejos blancos New Zealand. Tinción con hematoxilina-eosina (H/E) del tejido sinovial de las rodillas de los conejos. En la figura se muestra un ejemplo representativo de un conejo de cada grupo (20x). Izqda: Rodilla izquierda no tratada; Dcha: Rodilla derecha tratada (grupo 1: APO2L/TRAIL; grupo 2: LUVs-APO2L/TRAIL; grupo 3: LUVs). En la imagen se ha señalado la
25 presencia de infiltrado inflamatorio (i), la capa de células sinoviales (s), presencia de villus (v) y la presencia de vasos sanguíneos (x).

Figura 20. Muestra el examen microscópico de las rodillas en los distintos
30 grupos de conejos blancos New Zealand. Tinción con H/E del tejido sinovial de las rodillas de los conejos. En la figura se muestra un ejemplo representativo de un conejo de cada grupo (40x). Izqda: Rodilla izquierda no tratada; Dcha: Rodilla derecha tratada (grupo 1: APO2L/TRAIL; grupo 2: LUVs-

APO2L/TRAIL). En la imagen se ha señalado la presencia de infiltrado inflamatorio mononuclear (**m**), de infiltrado inflamatorio polimorfonuclear (**p**), la capa de células sinoviales (**s**) y la presencia de vasos sanguíneos (**x**).

5 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser
10 interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

15 **EJEMPLO 1. Generación de liposomas decorados con APO2L/TRAIL recombinante bioactivos.**

Expresión de la proteína APO2L/TRAIL recombinante.

Para la obtención de la proteína APO2L/TRAIL recombinante se ha empleado
20 el vector de expresión en células procariotas *pET19b* (Novagen, Gibbstown, NJ) con el cDNA clonado de la porción soluble de la proteína APO2L/TRAIL humana (codones 114-281) que expresa una cola de 10 histidinas (Pitti RM. *et al.* J Biol Chem 1996;271(22):12687-90). El plásmido *pET19b* contiene un gen de resistencia a la ampicilina y su promotor responde a la inducción con IPTG
25 (isopropil-beta-D-tiogalactosido). Se ha empleado dicho plásmido en la cepa de *E. Coli BL21-CodonPlus® (DE3)-RP* (Stratagene, La Jolla, CA) que contiene un plásmido adicional con un gen de resistencia a Cloranfenicol.

En primer lugar se han obtenido bacterias competentes de dicha cepa de *E.*
30 *Coli* usando un método basado en la apertura de poros en la membrana mediante CaCl_2 a baja temperatura. Tras cultivar las bacterias y cuando éste alcanza la fase de crecimiento exponencial, el cultivo se enfría en hielo durante

30 minutos para detener el crecimiento resuspendiéndose las bacterias en un tampón que contiene 0,1 M CaCl₂, 0,07 M MgCl₂ 0,04 M Acetato Sódico manteniéndolas en frío durante 15 minutos para que se formen los poros en la membrana bacteriana tras lo cual, las bacterias se centrifugan a 3.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se elimina el sobrenadante resuspendiéndose en un tampón de conservación que contiene 0,1 M CaCl₂ y 15% de Glicerol y se guardan a -80 °C hasta su utilización.

Las bacterias *E. Coli BL21-CodonPlus® (DE3)-RP* competentes se transforman con 50 ng de la construcción *pET19b-APO2L/TRAIL* siguiendo las instrucciones de la casa comercial *Stratagene*. Para ello, se ha empleado un método basado en el choque térmico incubando las bacterias competentes en hielo y posteriormente en baño húmedo a 42 °C. Las bacterias transformadas se siembran en placa de LB-Agar que contiene Ampicilina 100 µg/mL y se cultivan durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se selecciona una de las colonias transformadas y se crece en 10 mL de medio LB que contiene Ampicilina 100 mg/mL y Cloranfenicol 50 mg/mL dejándose en cultivo a 37 °C en agitación a 200 rpm durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se realiza una dilución 1/100 del cultivo bacteriano en medio LB sin antibióticos dejándose crecer durante 4-6 horas hasta que las bacterias transformadas se encuentran en fase exponencial del crecimiento (lectura de absorbancia a 600 nm de 0,6-0,8) momento en el que se induce la expresión de APO2L/TRAIL recombinante añadiendo al cultivo bacteriano 1mM IPTG e incubándolo a 37 °C en agitación durante 18 horas. Posteriormente se recolecta el cultivo bacteriano inducido mediante centrifugación a 3.500 rpm durante 30 minutos, se elimina el sobrenadante y el pellet se guarda a -20 °C hasta su utilización.

Plegamiento y Purificación de la proteína APO2L/TRAIL recombinante.

Para la purificación de APO2L/TRAIL se ha aprovechado que dicha proteína se expresa como una proteína de fusión unida a una cola de 10 histidinas (APO2L/TRAILHis₁₀) que tiene afinidad por los metales bivalentes como el

Cobalto (Co^{2+}). Por este motivo la purificación se ha realizado mediante cromatografía de afinidad con metal inmovilizado empleando la resina *BD TALON TM Metal Affinity Resin* (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) que contiene Co^{2+} .

5

En primer lugar se lava el pellet bacteriano con un tampón que contiene 0,05 M Fosfato Sódico pH 7,4, 1 M NaCl, 6 M Urea y 0,5% de Tritón X-100, se centrifuga a 3.500 rpm durante 30 minutos. Se descarta el sobrenadante y el pellet se resuspende en un tampón de solubilización que contiene 0,05 M Tris-HCl pH 8,5, 5 M de Cloruro de Guanidinio y 0,03 M DTT y se incuba a 4 °C en agitación durante 3 horas. El sobrenadante que contiene APO2L/TRAIL-His₁₀ se recolecta mediante centrifugación a 20.000 g durante 30 minutos a 4 °C y se diluye añadiéndolo gota a gota sobre el tampón de plegado 1 que contiene 0,05 M Tris-HCl pH 7,4, 0,4 M L-Arginina, 2 mM DTT, 0,5 M Urea y 0,5 M NaCl en agitación a 4 °C. El diluido obtenido se dializa frente al tampón de plegado 2 que contiene 0,05 M Tris-HCl pH 7,4, 1 mM DTT, 0,1 M Urea, 0,3 M NaCl durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, la solución se centrifuga a 20.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C para obtener el sobrenadante donde se encuentra APO2L/TRAIL-His₁₀ correctamente plegada y se incuba con una resina que contiene Co^{2+} siguiendo las instrucciones del fabricante para la purificación de proteínas recombinante en condiciones nativas. Por último, APO2L/TRAIL-His₁₀ se eluye de la resina mediante el tampón que contiene 0,05 M Fosfato Sódico pH 7,0, 0,3 M NaCl, 0,15 M Imidazol. La proteína recombinante recolectada se unifica y se elimina el Imidazol cambiando a otro tampón de dilución denominado KHE (0,1 M KCl, 10 mM Hepes, 0,1 mM EDTA, pH 7,0) empleando la columna *Disposable PD-10 Desalting Column* (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) o bien se concentra empleando el filtro *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter 10,000 NMWL* (Millipore, Billerica, MA) siguiendo en ambos casos las instrucciones del fabricante. La proteína obtenida se guarda a 4 °C hasta su utilización.

10
15
20
25
30

De todos los pasos de la purificación se guardan alícuotas que posteriormente son analizadas mediante electroforesis en gel al 12% de poliacrilamida-SDS (SDSPAGE) y tinción con azul de Coomassie (**Figura 1.A.**). En el cultivo de las bacterias *E. Coli BL21-CodonPlus® (DE3)-RP* transformadas y tratadas con 1 mM IPTG durante 18 horas se induce la expresión de APO2L/TRAIL recombinante aumentando la expresión de la banda de 22 kDa de peso molecular correspondiente a la proteína de fusión APO2L/TRAIL-His₁₀ (**Figura 1.A.: 1 y 2**). Al realizar el plegamiento de la proteína mediante el proceso de dilución y diálisis, aparece un precipitado en el que se encuentra la gran mayoría de proteínas bacterianas además de APO2L/TRAIL- His₁₀ en forma de cuerpos de inclusión que no se han solubilizado (**Figura 1.A.: 3**). En el sobrenadante obtenido se encuentra la proteína recombinante correctamente plegada (**Figura 1.A.: 4**). Tras incubar el extracto diluido y dializado con la resina que contiene Co²⁺ la intensidad de la banda correspondiente a APO2L/TRAIL-His₁₀ se ha reducido considerablemente lo que indica que APO2L/TRAIL-His₁₀ ha quedado mayoritariamente unida a la resina (**Figura 1.A.: 5**). Por último, tras eluir de la resina la proteína recombinante con 0,15 M de Imidazol, la banda correspondiente a APO2L/TRAIL-His₁₀ aparece en la fracción de elución (**Figura 1.A.: 7**).

20

Además se ha realizado Western-blot de la fracción de elución revelando con el anticuerpo monoclonal *His-Tag® Monoclonal Antibody (Novagen, Gibbstown, NJ)* que reconoce la cola de histidinas que incluye la mayoría de los vectores de expresión de Novagen como el *pET19b*, el anticuerpo monoclonal *Purified Mouse Anti-Human TRAIL (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)* y con un antisuero policlonal de conejo que reconoce APO2L/TRAIL generado previamente en nuestro laboratorio. El revelado del Western-blot del eluido de la resina empleando el anticuerpo monoclonal anti-His Tag, el anticuerpo monoclonal anti-TRAIL o un antisuero policlonal de conejo que reconoce APO2L/TRAIL, confirma que la banda de 22 kDa que se observa en la tinción con azul de Coomassie, es la proteína recombinante APO2L/TRAIL-His₁₀ (**Figura 1.B.**).

30

La proteína APO2L/TRAIL es un ligando mortal que induce apoptosis a través de la vía extrínseca. Para comprobar la bioactividad de la proteína purificada se realiza un ensayo de citotoxicidad sobre la línea celular Jurkat clon E6.1 y la línea celular RPMI 8226. Tras 24 horas de cultivo en presencia de APO2L/TRAIL-His₁₀ en ambos casos se observa la presencia de numerosas células con la típica morfología apoptótica (**Figura 2.**).

Generación de liposomas decorados con APO2L/TRAIL recombinante.

Los lípidos empleados para la generación de los liposomas son los siguientes: Fosfatidilcolina de huevo (PC), Esfingomielina porcina de cerebro (SM), Colesterol bovino (CHOL) y 1,2,-dioleoil-sn-glicerol-3-{succinil [ácido N-(5-amino-1-carboxilpentil)] iminodiacético iminodiacético} funcionalizado con níquel (DOGS-NTA-Ni) (*Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL*). La mezcla de lípidos se prepara en Cloroformo, se seca en tubos de cristal mediante flujo de Nitrógeno durante 30 minutos y luego mediante vacío durante 2 horas. Los lípidos se resuspenden en tampón KHE y la suspensión se somete a 10 ciclos de congelación/descongelación y luego se somete un proceso de extrusión 10 veces a través de dos membranas de Policarbonato con un poro de 200 nm (*Whatman, Maidstone, UK*) usando un *Extruder* (*Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL*) para obtener los liposomas de tipo LUVs (*Large Unilamellar Vesicles*). Los LUVs generados tienen una composición lipídica con una mezcla de PC, SM, CHOL y DOGS-NTA-Ni en una proporción de 55:30:10:5 similar a la conocida de los exosomas naturales que contienen ligandos mortales secretados de manera fisiológica por las células. Además, se han generado LUVs con una proporción de DOGS-NTA-Ni del 0, 1, 2,5% (p/p) manteniendo la misma proporción de lípidos anteriormente descrita excepto la de PC.

Los LUVs se incuban con la proteína APO2L/TRAIL-His₁₀ a una relación molar proteína:lipido de 1:2.000 durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se recolectan los LUVs-APO2L/TRAIL mediante ultracentrifugación a 60.000 rpm

durante 5 horas a 4 °C y el pellet obtenido se resuspende en tampón KHE estéril y se guardan a 4 °C hasta su utilización.

5 La unión de APO2L/TRAIL a los LUVs se analiza mediante electroforesis en gel al 12 % de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y tinción con azul de Coomassie tanto del pellet como del sobrenadante obtenido (**Figura 3.**)

10 La concentración de proteína unida a los LUVs se valora mediante los métodos de cuantificación de BCA y Bradford y la concentración lipídica de los LUVs mediante el método de Fiske.

15 Se comprueba que la unión de APO2L/TRAIL-His₁₀ a los LUVs depende de la presencia del lípido DOGS-NTA-Ni de modo que cuando la proteína se incuba con LUVs con un 5% de DOGS-NTA-Ni se une a los liposomas encontrándose en el pellet (**Figura 3.: 2**) mientras que cuando APO2L/TRAIL-His₁₀ se incuba con LUVs sin DOGS-NTA-Ni toda la proteína aparece en el sobrenadante (**Figura 3.: 9**). La incubación de la proteína recombinante con los LUVs con un 2,5 y un 1% de lípido quelante de Níquel no consigue unir toda la proteína apareciendo parte de ésta en el sobrenadante y parte unida a los LUVs en el
20 pellet (**Figura 3.: 4 y 6; 5 y 7** respectivamente).

En los estudios que se detallan a continuación se emplean LUVs-APO2L/TRAIL con una proporción de DOGS-NTA-Ni del 5% (p/p).

25 Para comprobar la bioactividad de los LUVs-APO2L/TRAIL se realiza un ensayo de citotoxicidad sobre la línea celular tumoral humana Jurkat clon E6.1 (**Figura 4.**). Tras 24 horas de cultivo se observa que los LUVs 5% Ni-APO2L/TRAIL presentes en el pellet inducen la apoptosis de la mayoría de las células mientras que la incubación de las células con la misma cantidad de sobrenadante no induce la muerte celular de las mismas. Además, la
30 citotoxicidad inducida por los LUVs-APO2L/TRAIL se debe a la presencia de la

proteína recombinante ya que la incubación en presencia de LUVs 5% control (no incubados con APO2L/TRAIL-His₁₀) no induce apoptosis.

5 **EJEMPLO 2. Uso de los LUVs-APO2L/TRAIL para el tratamiento de un tumor o un cáncer.**

Se ha descrito el uso de diversas formas recombinantes de TRAIL/APO2 en ensayos preclínicos *in vitro* e *in vivo* para inducir la apoptosis de células tumorales, bien en monoterapia, bien en combinación con otras terapias De hecho, su uso para el tratamiento de diversas neoplasias malignas se está evaluando actualmente en diversos ensayos clínicos (Johnstone et al. Nat Rev Cancer. 2008 Oct; 8:782-98). En la presente memoria se evalúa la capacidad de inducir muerte celular de los liposomas LUVs-APO2L/TRAIL sobre distintas líneas celulares tumorales de origen humano. Los estudios de citotoxicidad realizados *in vitro* han puesto de manifiesto que la capacidad de inducir muerte celular con LUV-APO2L/TRAIL es mayor que con APO2L/TRAIL soluble. Por tanto, el uso de liposomas decorados con APO2L/TRAIL es una terapia eficaz para el tratamiento del cáncer.

20 **MATERIAL Y MÉTODOS**

Tras la obtención y optimización de los LUVs-APO2L/TRAIL se han realizado estudios de su bioactividad analizando su capacidad de inducir muerte celular *in vitro* en distintas líneas celulares tumorales en paralelo con APO2L/TRAIL-His₁₀ soluble.

Para ello, se han realizado ensayos de inducción de muerte celular sobre distintas líneas celulares tumorales: Jurkat clon E6.1 (proveniente de una leucemia linfoblástica humana aguda tipo T), RPMI 8226 (proveniente de un plasmocitoma humano de origen B), U266 (proveniente de un mieloma/plasmocitoma humano de origen B), IM-9 (proveniente de un mieloma/plasmocitoma humano de origen B), MM1.S (proveniente de

mieloma/plasmocitoma humano de origen B), A549 (proveniente de un adenocarcinoma de pulmón humano), U937 (proveniente de un linfoma histiocítico) y U937-Bcl2 (proveniente de la línea parental U937 en la que se ha sobre-expresado la proteína anti-apoptótica Bcl2).

5

Se han realizado ensayos de dosis-respuesta incubando las líneas Jurkat clon E6.1 y RPMI 8226 con las siguientes dosis: 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1.000 ng/mL y el resto de las líneas con las dosis: 10, 50, 100, 500 y 1.000 ng/mL durante 24 horas tanto de APO2L/TRAIL-His₁₀ soluble como de LUVs-APO2L/TRAIL valorando la muerte celular mediante tinción con azul Tripán, mediante una variante del método de Mossman de reducción del MTT (dimetil-tiazolil-tetrazoloilo) y mediante análisis por citometría de flujo de la translocación de Fosfatidilserina a la cara externa de la membrana celular mediante la unión de Anexina-V conjugada con Ficoeritrina (PE) en el caso de las líneas celulares Jurkat clon E6.1, U266, IM-9, MM1.S y A549 o con Fluoresceína (FITC) en el caso de la línea celular RPMI 8226.

10
15

Los ensayos de citotoxicidad se han realizado en ausencia o en presencia del anticuerpo bloqueante anti-APO2L/TRAIL denominado 5C2 (amablemente cedido por el Dr. Ashkenazi, *Genentech, San Diego, CA*) para comprobar que la citotoxicidad observada en las líneas celulares incubadas tanto con APO2L/TRAIL-His₁₀ soluble como con LUVs-APO2L/TRAIL es específica y debida a este ligando mortal.

20

Los resultados de los estudios de citotoxicidad se muestran como la media \pm desviación estándar de al menos 2 experimentos distintos.

25

Para todos los estudios de comparación entre variables cuantitativas ha sido aplicado el test de la *t* de Student.

30

En todos los casos, se ha considerado como significativamente estadístico un valor de $p < 0,05$.

Los datos estadísticos han sido analizados usando el *software SPSS for Windows Release 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)*.

RESULTADOS

5

En primer lugar se ha analizado la citotoxicidad *in vitro* sobre distintas líneas celulares tumorales de origen humano realizando curvas de dosis-respuesta en paralelo con APO2L/TRAIL soluble y LUVs-APO2L/TRAIL y analizando los resultados mediante tinción con azul de Tripán, mediante una variante del método de Mossman o mediante análisis por citometría de flujo de las células Anexina-V positivas (células apoptóticas).

10

Los resultados en los ensayos de citotoxicidad con la línea Jurkat clon E6.1 muestran que los LUVs-APO2L/TRAIL tienen un efecto citotóxico mayor que el de APO2L/TRAIL soluble. Cuando se analiza en paralelo la capacidad de inducir la muerte celular por cualquiera de los métodos anteriormente citados se observa que la concentración inhibitoria media (IC50) es claramente inferior (entre 3 y 7 veces) en el caso de los liposomas decorados con APO2L/TRAIL cuando se comparan con APO2L/TRAIL soluble (**Figura 5.**).

15

En el caso de la línea celular RPMI 8226, los LUVs-APO2L/TRAIL también inducen la muerte celular de una manera más eficiente que APO2L/TRAIL soluble observándose una IC50 aproximadamente 2 veces menor en el caso de los LUVs-APO2L/TRAIL cuando se comparan con APO2L/TRAIL soluble (**Figura 6.**).

20

Para comprobar que el efecto citotóxico observado en estos experimentos se debe a APO2L/TRAIL, los ensayos de citotoxicidad se hacen en presencia del anticuerpo bloqueante anti-APO2L/TRAIL 5C2. En ambas líneas tumorales el efecto citotóxico de APO2L/TRAIL es revertido cuando la incubación se realiza en presencia de 5C2. En el caso de APO2L/TRAIL soluble es necesaria una dosis de 100 ng/mL de 5C2 para conseguir la inhibición de la muerte celular

25

30

5 producida por APO2L/TRAIL a una dosis de 100 ng/mL mientras que en el caso de los LUVs-APO2L/TRAIL, para inhibir la muerte celular producida por la misma dosis de 100 ng/mL, es necesario emplear una dosis de 5C2 de 1.000 ng/mL lo que indica que la eficiencia en la señal apoptótica es mayor en el caso de los LUVs-APO2L/TRAIL (**Figura 7.**).

10 Por último, se ha ampliado el estudio de citotoxicidad a otras líneas celulares tumorales de origen humano: U266, IM-9, MM1.S, A549, U937 y U937-Bcl2 (**Figura 8.**). Los análisis indican que en todas ellas, la capacidad de inducir muerte celular es mayor en el caso de los LUVs-APO2L/TRAIL que en el caso de APO2L/TRAIL soluble cuando se analiza en paralelo. Incluso en la línea U937-Bcl2 los LUVs-APO2L/TRAIL son capaces de superar el efecto anti-apoptótico de la proteína Bcl2 de una manera más efectiva que APO2L/TRAIL soluble.

15

EJEMPLO 3. Uso de los LUVs-APO2L/TRAIL para el tratamiento de la AR.

20 Por otra parte, APO2L/TRAIL también está implicado en la regulación del sistema inmune y en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como la artritis reumatoide (AR). Se ha descrito el uso de APO2L/TRAIL recombinante para el tratamiento de la AR (Yao et al. 2006. Arthritis Res Ther 8: R16). En la presente memoria, utiliza un modelo animal de artritis inducida por antígeno (AIA) para demostrar que la inyección intra-articular de LUV-APO2L/TRAIL es capaz de reducir la inflamación de las articulaciones afectadas de artritis de manera más eficaz que cuando se
25 inyecta la proteína APO2L/TRAIL soluble. Por tanto, el uso de liposomas decorados con APO2L/TRAIL es una terapia eficaz para el tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, como la AR.

30

MATERIAL Y MÉTODOS

Inducción de la artritis inducida por antígeno (AIA) en conejos blancos New Zealand.

5

Basándose en la literatura científica previa (Sanchez-Pernaute O. *et al.* Rheumatol 2003;42:19–25; Lo YJ. *et al.* Rheumatol Int 2007;27(12):1099-111; Keravala A. *et al.* Arthritis Res Ther 2006;8(4):R91; Nakaya H. *et al.* Arthritis Rheum 2005;52:2559-2566; Yao Q. *et al.* Arthritis Res Ther 2006;8(1):R16) se ha inducido una AIA en conejos blancos New Zealand para valorar *in vivo* la eficacia del tratamiento con LUVs-APO2L/TRAIL en un modelo animal de artritis. Para ello, se han sensibilizado conejos blancos New Zealand mediante dos inyecciones intra-dérmicas (i.d.) de 5 mg de ovoalbúmina (OVA, *Sigma, St. Louis, MO*) con adyuvante autorizado.

15

Posteriormente se ha inducido la AIA en ambas mediante la inyección intra-articular (i.a.) de 5 mg de OVA disuelta en PBS estéril. El protocolo empleado para la inducción de la AIA se representa esquemáticamente en la **Figura 9**.

20

Inducción de la artritis inducida por antígeno (AIA) en conejos blancos New Zealand.

Basándonos en la literatura científica previa (Sanchez-Pernaute O. *et al.* Rheumatol 2003;42:19–25; Lo YJ. *et al.* Rheumatol Int 2007;27(12):1099-111; Keravala A. *et al.* Arthritis Res Ther 2006;8(4):R91; Nakaya H. *et al.* Arthritis Rheum 2005;52:2559-2566; Yao Q. *et al.* Arthritis Res Ther 2006;8(1):R16) se ha inducido una AIA en conejos blancos New Zealand para valorar *in vivo* la eficacia del tratamiento con LUVs-APO2L/TRAIL en un modelo animal de artritis. Para ello, se han sensibilizado conejos blancos New Zealand mediante dos inyecciones intra-dérmicas (i.d.) de 5 mg de ovoalbúmina (OVA, *Sigma, St. Louis, MO*) con adyuvante autorizado.

30

Posteriormente se ha inducido la AIA en ambas mediante la inyección intra-articular (i.a.) de 5 mg de OVA disuelta en PBS estéril. El protocolo empleado para la inducción de la AIA se representa esquemáticamente en la Figura 1.

5 Utilización de los LUVs-APO2L/TRAIL para el tratamiento de la AIA.

El experimento se ha realizado en 19 conejos blancos New Zealand distribuidos en los siguientes grupos según el tratamiento recibido:

- 10 1. Grupo APO2L: 5 conejos a los que 24 horas después de inducirles la AIA en ambas rodillas, se ha tratado la rodilla derecha mediante inyección i.a. de 5 μ g de APO2L/TRAIL-His₁₀ soluble en 0,5 mL de PBS estéril mientras que en la rodilla izquierda se les ha inyectado 0,5 mL de PBS estéril.
- 15 2. Grupo LUVs-APO2L: 5 conejos a los que, tras inducirles la AIA en ambas rodillas, 24 horas después se ha tratado la rodilla derecha mediante inyección i.a. de LUVs decorados con 5 μ g de APO2L/TRAIL en 0,5 mL de PBS estéril mientras que en la rodilla izquierda se les ha inyectado 0,5 mL de PBS estéril.
- 20 3. Grupo LUVs: 3 conejos en los que se ha inducido la AIA en ambas rodillas y 24 horas después se les ha tratado la rodilla derecha mediante inyección i.a. de LUVs en 0,5 mL de PBS estéril a la misma concentración que en el grupo 2 mientras que en la rodilla izquierda se les ha inyectado 0,5 mL de PBS estéril.
- 25 4. Grupo Control: 6 conejos a los que se les ha realizado las 2 inyecciones de sensibilización y en los que la inyección i.a. en ambas rodillas se ha realizado con 0,5 mL de PBS. En estos conejos, en la rodilla izquierda no se ha realizado ningún tratamiento mientras que en la rodilla derecha se han realizado los siguientes tratamientos según el subgrupo:
 - 30 4.1. Control-APO2L: en 2 conejos se ha inyectado APO2L/TRAIL-His₁₀ soluble en 0,5 mL de PBS estéril.

4.2. Control-LUVs-APO2L: en 2 conejos se ha inyectado liposomas decorados con APO2L/TRAIL en 0,5 mL de PBS estéril.

5 4.3. Control-LUVs: en 2 conejos se ha inyectado los LUVs en 0,5 mL de PBS estéril.

Este último grupo sirve por una parte como control sano (rodillas no tratadas) y por otra parte como control negativo para comprobar la falta de efecto de los tratamientos en ausencia de AIA (rodillas tratadas).

10

El seguimiento de los conejos se ha realizado durante 8 días desde la inyección i.a. de inducción de la AIA (7 días desde los tratamientos recibidos según el grupo al que pertenezcan) y ha consistido en la medición diaria del diámetro latero-lateral de las rodillas y en la medición del peso de cada animal.

15

Tras estos 8 días, se ha procedido al sacrificio de los animales, al examen macroscópico de las rodillas abiertas y la exéresis quirúrgica de la bolsa sinovial retro-patelar de ambas rodillas. Los tejidos se fijaron en formaldehído al 10% y posteriormente se parafinaron y cortaron en microtomo en portas seriados de 5 micras de grosor para su posterior estudio histológico mediante

20

tinción con Hematoxilina/Eosina (H/E, *Merck, Darmstadt, Alemania*).

Además a todos los animales se les ha realizado extracciones de sangre los días 31 (día de la inducción de la AIA previamente a la inyección i.a.), 32 (día de los tratamientos previamente a la inyección i.a.) y 39 (día del sacrificio) para

25

la determinación analítica de factor reumatoide (FR) y la transaminasa alaninoaminotransferasa (ALT).

Se han realizado 2 experimentos más con 10 y 13 conejos respectivamente siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito empleando una dosis de

30

10 µg de APO2L/TRAIL.

Evaluación histopatológica de la AIA.

La evaluación histopatológica del grado de inflamación sinovial presente en los cortes teñidos con H/E se ha realizado basándonos en la escala de puntuación descrita previamente para este modelo animal de artritis (Sanchez-Pernaute O. *et al.* Arthritis Rheum 1997; 40:2147–56, **Tabla 1.**)

Se han analizado los siguientes criterios: presencia de infiltrado inflamatorio, aumento del número de capas de células sinoviales, formación de villus y aumento de la vascularización con una puntuación de 0 para el tejido sano a 13 para la inflamación más severa. La totalidad del tejido sinovial presente en cada porta ha sido examinado mediante microscopía óptica a un aumento de 20× sin conocimiento del grupo al que pertenecía dicho porta y el resultado se ha expresado como la media \pm la desviación estándar de todos los campos examinados.

Tabla 1. Criterios para la evaluación histológica de la AIA.

Parametro	Puntuación
Inflamación	0 = Normal
	1 = Infiltración inflamatoria mínima
	2 = Infiltración inflamatoria media
	3 = Infiltración inflamatoria moderada
	4 = Infiltración inflamatoria marcada
	5 = Infiltración inflamatoria severa
Nº capas células sinoviales	0 = Normal (1-2 capas de células)
	1 = Hiperplasia leve (2-3 capas de células)
	2 = Hiperplasia moderada (3-5 capas de células)
	3 = Hiperplasia marcada (5 o más capas de células)
Formación de villus	0 = Normal
	1 = Mínima (1-2 villi)
	2 = Severa (3 o más villi)
Vascularización	0 = Normal (número limitado de vasos)
	1 = Hipervascularización leve (presencia focal de escasos vasos pequeños)
	2 = Hipervascularización moderada (presencia focal de numerosos vasos pequeños)
	3 = Hipervascularización marcada (numerosos vasos ampliamente distribuidos)

Basado en: Sanchez-Pernaute O, *et al.* Arthritis & Rheum 1997;40:2147–56.

Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos de la medición del diámetro latero-lateral de las rodillas se muestran como la media \pm la desviación estándar de las mediciones
5 tomadas por dos observadores de manera independiente de las medias de los animales de cada grupo. Los resultados obtenidos de la medición de la pérdida de peso, FR, ALT se muestran como la media \pm la desviación estándar de los animales de cada grupo.

Los resultados del análisis histopatológico de los cortes teñidos con H/E se
10 muestran como la media \pm la desviación estándar de todos los campos examinados en cada porta.

Para todos los estudios de comparación entre variables cuantitativas ha sido aplicado el test de la *t* de *Student*.

15

En todos los casos, se ha considerado como significativamente estadístico un valor de $p < 0,05$.

Los datos estadísticos han sido analizados usando el *software SPSS for*
20 *Windows Release 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)*.

RESULTADOS

Inducción de la artritis inducida por antígeno (AIA) en conejos blancos
25 **New Zealand.**

Tal y como se indica en Material y Métodos, se induce la AIA en ambas rodillas mediante inyección i.a. de 5 mg de OVA en 13 conejos blancos New Zealand previamente sensibilizados (Grupo AIA). En 6 conejos sensibilizados la
30 inyección i.a. se realiza con PBS (Grupo Control).

Veinticuatro horas después de la inducción, la artritis se genera correctamente en todas las rodillas de todos los conejos del grupo AIA produciéndose un aumento significativamente estadístico en el diámetro latero-lateral de todas las rodillas mientras que en el grupo Control la inyección i.a de PBS no produce un aumento significativo del diámetro latero-lateral de las rodillas (**Figura 10.A.**)
5 En el grupo AIA, la artritis se mantiene hasta el día del sacrificio sin observarse diferencias significativas en la medición del diámetro latero-lateral de las rodillas respecto al día del inducción de la AIA.

10 La artritis se induce de manera similar en ambas rodillas sin observarse diferencias estadísticamente significativas en el diámetro latero-lateral ni entre las rodillas izquierdas y las derechas ni tampoco entre los 3 grupos en los que se va a realizar los distintos tratamientos de la AIA (Grupo 1: APO2L; Grupo 2: LUVs-APO2L; Grupo 3: LUVs, **Figura 10.B.**)

15 En lo referente al peso de los animales, en el grupo AIA se produce un descenso del peso el día del sacrificio estadísticamente significativo respecto al peso el día de la inducción de la AIA mientras que en el grupo Control, no se produce variación en el peso a lo largo del experimento y hasta el día del sacrificio (**Figura 11.**)
20

En cuanto al FR, un parámetro analítico característico de la AR, aumenta de manera significativa en el grupo AIA el día del sacrificio respecto a los valores observado en el grupo Control (**Figura 12.**)

25

Efecto del tratamiento de la AIA con LUVs-APO2L/TRAIL.

Tras comprobar que la artritis se ha inducido correctamente, 24 horas después se realiza el tratamiento mediante inyección i.a. Los 13 conejos en los que se ha inducido la AIA se distribuyen aleatoriamente en 3 grupos: 5 conejos a los que se les inyecta vía i.a. 5 µg de APO2L/TRAIL-His₁₀ en su rodilla derecha (Grupo 1), 5 conejos a los que se les inyecta vía i.a. 5 µg de LUVs-
30

APO2L/TRAIL en su rodilla derecha (Grupo 2) y a 3 conejos a los que se les inyecta ía i.a. la misma concentración de LUVs que al grupo 2 en este caso sin APO2L/TRAIL (Grupo 3). En la rodilla izquierda de todos los conejos de los 3 grupos se inyecta de vía i.a. PBS estéril. Estas rodillas sirven como control interno en cada animal de la evolución natural de la AIA sin tratamiento.

En las rodillas no tratadas del grupo 1 del grupo 2, la inflamación observada tras 24 horas de la inducción, se mantiene hasta el día del sacrificio. Sin embargo en las rodillas tratadas, tanto en el grupo 1 (tratamiento con 5 µg de APO2L/TRAIL recombinante soluble) como en el grupo 2 (tratamiento con LUVs decorados con 5 µg de APO2L/TRAIL), el día del sacrificio se observa un descenso de la inflamación respecto la observada a las 24 horas de la inducción. Cuando se compara el diámetro latero-lateral de las rodillas no tratadas y las tratadas en cada grupo, el descenso observado en las rodillas tratadas con LUVs-APO2L/TRAIL del grupo 2 llega a ser estadísticamente significativo mientras que en el grupo 1 el descenso observado en las rodillas tratadas con APO2L/TRAIL soluble no alcanza niveles significativos. En el grupo 3 la inyección i.a. de LUVs sin APO2L/TRAIL no tiene ningún efecto sobre la inflamación de modo que las rodillas tratadas presentan una inflamación similar a las rodillas no tratadas (**Figura 13.A.**).

En el grupo Control, ninguno de los 3 tratamientos que se inyectan en los 3 subgrupos, produce cambios significativos en el diámetro de las rodillas tratadas respecto a las rodillas no tratadas, esto es ninguno de los 3 tratamientos tiene efecto en ausencia de AIA (**Figura 13.B.**).

Cuando se comparan las medias de las diferencias entre los diámetros de las rodillas no tratadas y las tratadas en cada grupo se observa que esta diferencia es estadísticamente mayor en el grupo 2 que en el grupo 1. En el grupo 3, apenas hay diferencias entre el diámetro de las rodillas tratadas y no tratadas en el momento del sacrificio, esto es, no hubo descenso de la inflamación de las rodillas tratadas (**Figura 14.**).

Se ha descrito que APO2L/TRAIL-His₁₀ puede tener un efecto hepatotóxico atribuible a la presencia de la cola de histidinas (Lawrence D. *et. al.* Nature Med 2001;7(4):383-5). Para comprobar que la inyección i.a. tanto de APO2L/TRAIL-His₁₀ como de LUVs-APO2L/TRAIL no presenta toxicidad sistémica, se realiza la determinación del enzima hepático ALT en el suero de los conejos. En el grupo AIA 24 horas después de la inducción de la artritis se produce un aumento en los niveles séricos de ALT de modo que el día del sacrificio los niveles séricos vuelven a valores similares a los previos a la inducción de la AIA (**Figura 15.A.**). Este aumento transitorio y posterior descenso hasta valores normales el día del sacrificio se observa también en los 3 grupos de tratamiento por separado (**Figura 15.B.**). En el grupo Control los niveles de ALT en suero no varían a lo largo del experimento. Estos datos indican que el aumento transitorio de la ALT en los conejos con AIA se debe a la inducción de la artritis y no tienen que ver con un efecto sistémico adverso de APO2L/TRAIL-His₁₀.

En los 2 experimentos realizados utilizando una dosis de 10 µg de APO2L/TRAIL soluble o asociado a LUVs, los resultados en la medición del diámetro latero-lateral de las rodillas son similares a los del primer experimento en el que se ha empleado 5 µg de APO2L/TRAIL. (**Figura 16.**)

Tras el sacrificio de los animales se procede al examen macroscópico de las rodillas abiertas (**Figura 17.**).

En las rodillas izquierdas no tratadas de los 3 grupos de tratamiento se observa un aumento del tamaño y de la pigmentación de la bolsa sinovial retro-patelar debido a la inflamación producida por la artritis (**Figura 17. A. C. E.**). En las rodillas derechas tratadas del grupo 1 (**Figura 17. B.**) y sobre todo en el grupo 2 (**Figura 17. D.**) se observa una menor inflamación comparada con las rodillas no tratadas. En las rodillas tratadas del grupo 3 (**Figura 17.F.**) la inflamación de la bolsa retro-patelar es similar a las rodillas no tratadas. Por último, en el grupo

4 (Control) tanto las rodillas no tratadas como las tratadas presentan una anatomía macroscópica normal (**Figura 17. G. H.**).

5 El examen histopatológico del tejido sinovial en los cortes teñidos con H/E se ha realizado basándonos en la escala de evaluación descrita previamente por Sanchez-Pernaute O. y colaboradores para este modelo animal de artritis. Tal y como se ha descrito anteriormente en Material y Métodos, se ha examinado la totalidad del tejido sinovial presente en cada porta mediante microscopía óptica a un aumento de 20× y el resultado se ha expresado como la media ± la
10 desviación estándar de todos los campos examinados para cada uno de los 4 parámetros analizados (**Tabla 2.**).

Tabla 2. Evaluación histopatológica de la AIA en los distintos grupos.

Rodillas	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
No tratadas	7,199 ± 1,309	7,946 ± 2,046	8,694 ± 1,522	0,139 ± 0,063
Tratadas	5,722 ± 1,175	5,159 ± 0,585 *	9,167 ± 1,449	0,067 ± 0,033

* p<0.05

15 Cuando se analiza el índice histológico por grupos, las rodillas no tratadas de los grupos 1, 2 y 3 presentan unos índices elevados (entre 7 y 8,5 aproximadamente según el grupo) sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre grupos. En las rodillas tratadas, tanto en el grupo 1 como en el grupo 2, se observa un índice histológico menor que en el caso de las rodillas no tratadas de modo en el grupo 2 la diferencia entre el índice de las
20 rodillas tratadas y no tratadas es estadísticamente significativo. En el grupo 3 el índice histológico de las rodillas tratadas es elevado y similar al de las rodillas no tratadas. El grupo Control presenta unos índices histológicos prácticamente de 0 (normalidad) no observándose diferencias entre las rodillas no tratadas y las tratadas con cualquiera de los 3 tratamientos (según el subgrupo).

25

Quando se analizan por separado los 4 parámetros histológicos (infiltrado inflamatorio, hiperplasia sinovial, formación de villus y aumento de la

vascularización, **Figura 18.**) se observa que en el grupo 2 el tratamiento con LUVs-APO2L/TRAIL es capaz de reducir todos ellos llegando a ser significativo el descenso observado en el infiltrado inflamatorio y en la hiperplasia sinovial. En el grupo 1, el tratamiento con APO2L/TRAIL soluble es capaz de reducir la hiperplasia sinovial, donde se llega a observar un descenso significativo, la formación de villus y la hipervascularización pero no tiene efecto sobre el infiltrado inflamatorio. En el grupo 3, el tratamiento con LUVs no tiene ningún efecto sobre ninguno de los 4 parámetros analizados. Por último, en el grupo 4 el índice tanto de las rodillas no tratadas como las tratadas es similar y prácticamente de 0 en los 4 parámetros sin observarse diferencias entre los distintos subgrupos según el tratamiento recibido.

En la **Figura 19** se muestra la tinción con H/E de los cortes del tejido sinovial de las rodillas izquierdas (no tratadas) y las rodillas derechas (tratadas) de un conejo representativo de cada grupo a un aumento de 20x. En las rodillas izquierdas de los conejos del grupo 1 (índice histológico: 9,381) y del grupo 2 (índice histológico: 10,511) se observa un abundante infiltrado inflamatorio, una marcada hiperplasia sinovial con un aumento en el número de capas de células sinoviales (más de 5 capas de células sinoviales en ambas), un importante aumento en el número de vasos sanguíneos y la formación de villus. En la rodilla tratada con APO2L/TRAIL del conejo del grupo 1 (índice histológico: 7,700) se puede observar una disminución en el número de capas de células sinoviales así como en el número de vasos sanguíneos presentes en el tejido cuando se compara con la rodilla no tratada del mismo conejo, sin embargo, se observa un abundante infiltrado inflamatorio similar al de la rodilla no tratada. En el caso del conejo del grupo 2 en la rodilla tratada con LUVs-APO2L/TRAIL (índice histológico: 5,998) además de una importante disminución del número de vasos sanguíneos y de la hiperplasia sinovial que en su mayor parte presenta una única capa de células sinoviales, se observa un importante descenso del infiltrado inflamatorio cuando se compara con la rodilla no tratada del mismo conejo.

En el grupo 3 tanto la rodilla no tratada (índice histológico: 9,833) como la tratada con LUVs (índice histológico: 10,500) presentan un abundante infiltrado inflamatorio, una marcada hiperplasia de las células sinoviales, un importante incremento en la vascularización del tejido así como la formación de villus sin que se observe diferencias significativas entre ambas rodillas. Por último en el grupo 4 (Control) el tejido sinovial es normal tanto en las rodillas no tratadas como en las que han sido tratadas con cualquiera de los 3 tratamientos sin observarse diferencias en los 3 subgrupos (grupo 4-1: índices histológicos: 0,200 y 0,284; grupo 4-2: índices histológicos: 0,083 y 0,222; grupo 4-3: índices histológicos: 0,180 y 0,111).

En la **Figura 20** se muestra la tinción con H/E del tejido sinovial de la rodilla izquierda y la rodilla derecha de los mismos conejos del grupo 1 y del grupo 2 que en la figura anterior con mayor detalle (aumento de 40x).

En las rodillas izquierdas de los conejos del grupo 1 y 2 se observa un abundante infiltrado inflamatorio a expensas tanto de infiltrado de tipo mononuclear como de tipo polimorfonuclear, una marcada hiperplasia sinovial con un aumento en el número de capas de células sinoviales (más de 5 capas de células sinoviales en ambas) y un importante aumento en el número de vasos sanguíneos. En la rodilla derecha tratada del conejo del grupo 1 (APO2L/TRAIL) se puede observar una disminución en el número de capas de células sinoviales así como en el número de vasos sanguíneos presentes en el tejido cuando se compara con la rodilla no tratada del mismo conejo, sin embargo, se observa que el infiltrado inflamatorio tanto mononuclear como polimorfonuclear persiste en un grado similar al de la rodilla no tratada. En la rodilla derecha tratada (LUVs-APO2L/TRAIL) del conejo del grupo 2, se observa una importante disminución del número de vasos sanguíneos y de la hiperplasia sinovial que en su mayor parte presenta una única capa de células sinoviales y también, un importante descenso del infiltrado inflamatorio mononuclear y polimorfonuclear cuando se compara con la rodilla no tratada.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que comprende un liposoma recubierto, al menos, con la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID: 2 o cualquiera de sus variantes o porciones de las mismas biológicamente activas.
5
2. Compuesto según la reivindicación 1 donde el liposoma esta recubierto con una porción biológicamente activa de la proteína que presenta una identidad de, al menos, un 80% con la SEQ ID NO: 1.
10
3. Compuesto según la reivindicación 2 donde la porción biológicamente activa de la proteína presenta una identidad de, al menos, un 90% con la SEQ ID NO: 1.
- 15 4. Compuesto según la reivindicación 3 donde la porción biológicamente activa de la proteína presenta una identidad de, al menos, un 95% con la SEQ ID NO: 1.
- 20 5. Compuesto según la reivindicación 4 donde la porción biológicamente activa de la proteína es la SEQ ID NO: 1.
- 25 6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID: 2 o cualquiera de sus variantes o porciones de las mismas tiene unida en su extremo amino-terminal, al menos, 6 histidinas.
- 30 7. Compuesto según la reivindicación 6 donde la proteína de secuencia aminoacídica SEQ ID: 2 o cualquiera de sus variantes o porciones de las mismas tiene unida en su extremo amino-terminal, al menos, 10 histidinas.

8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde el liposoma es unilamelar grande (LUV) con un diámetro de entre 40 nm y 500 nm.
- 5 9. Compuesto según la reivindicación 8 donde el LUV tiene un diámetro de entre 100 nm y 200 nm.
- 10 10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde el liposoma comprende al menos un fosfolípido seleccionado de entre: fosfatidilcolina y/o esfingomiélin.
11. Compuesto según la reivindicación 10 donde el liposoma comprende además un estero.
- 15 12. Compuesto según la reivindicación 11 donde el estero es el colestero.
13. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 donde el liposoma comprende además un lípido quelante.
- 20 14. Compuesto según la reivindicación 13 donde el lípido quelante es DOGS-NTA-Ni.
15. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la elaboración de un medicamento.
- 25 16. Uso del compuesto según la reivindicación 15 para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de un cáncer.
- 30 17. Uso del compuesto según la reivindicación 16 donde el cáncer se selecciona de entre: linfoma, leucemia, plasmocitoma, mieloma o cáncer de pulmón.

18. Uso del compuesto según la reivindicación 15 para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes.

5 19. Uso del compuesto según la reivindicación 18 donde la enfermedad inflamatoria o autoinmune es la artritis reumatoide.

20. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

10

21. Composición farmacéutica según la reivindicación 20 que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

22. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 20 ó 21 que comprende además otro principio activo.

15

20

25

30

35

40

FIG. 1

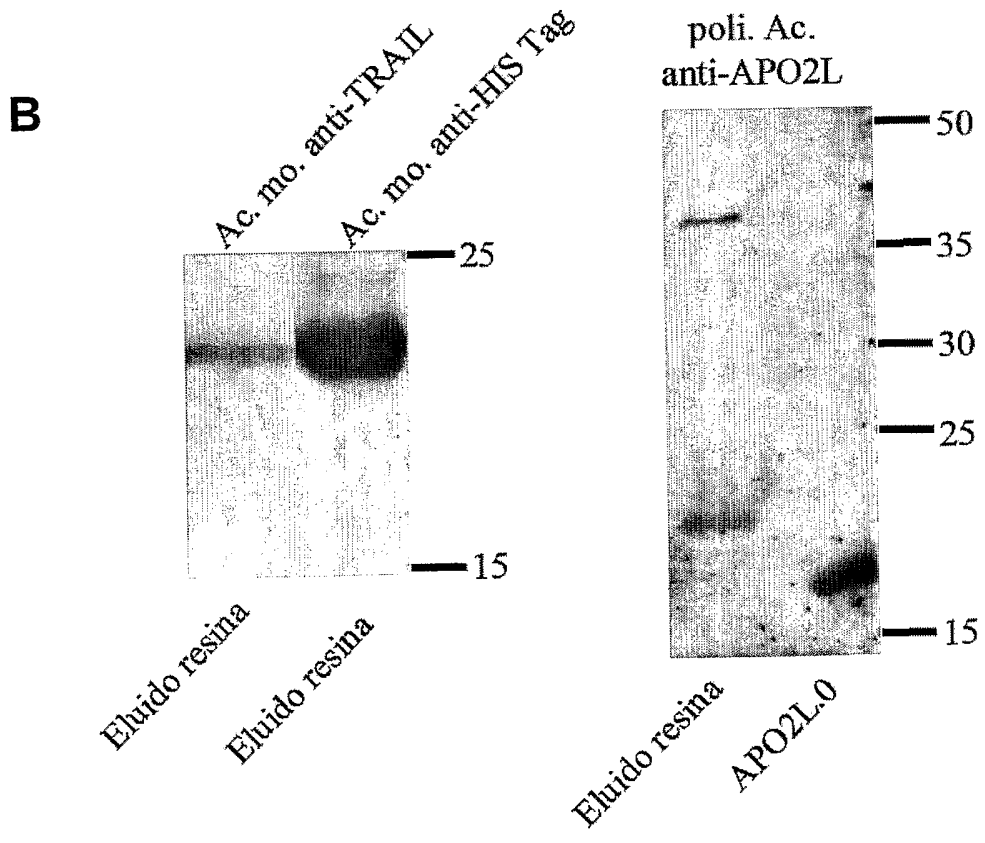
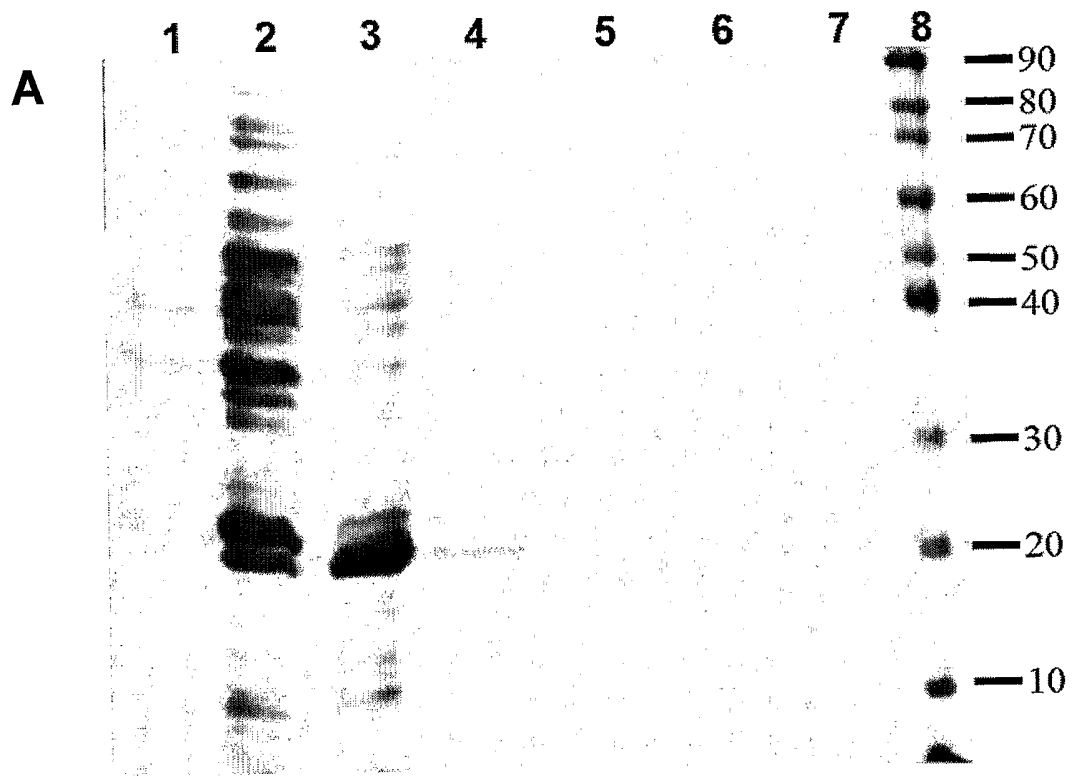
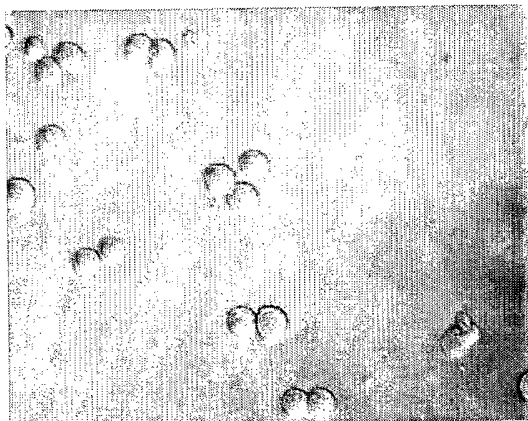


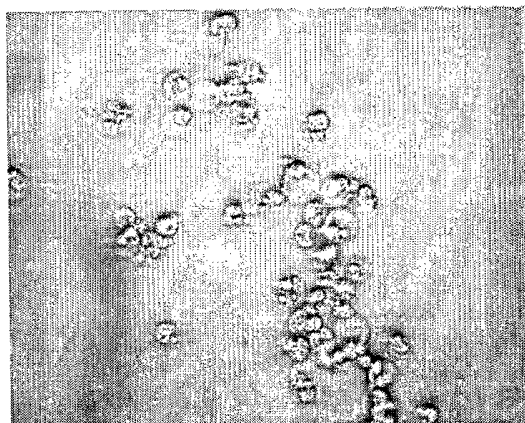
FIG.2

JURKAT clon E6.1

CONTROL

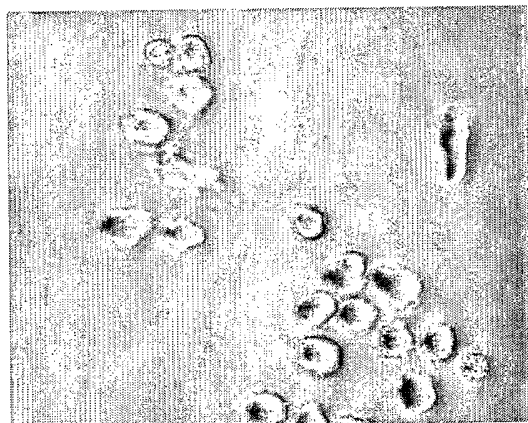


APO2L/TRAIL-His₁₀ 1000 ng/mL



RPMI 8226

CONTROL



APO2L/TRAIL-His₁₀ 100 ng/mL

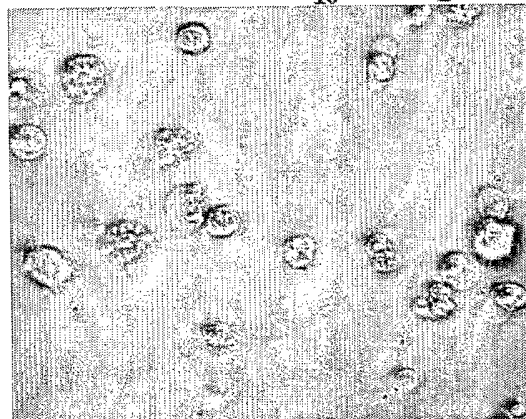
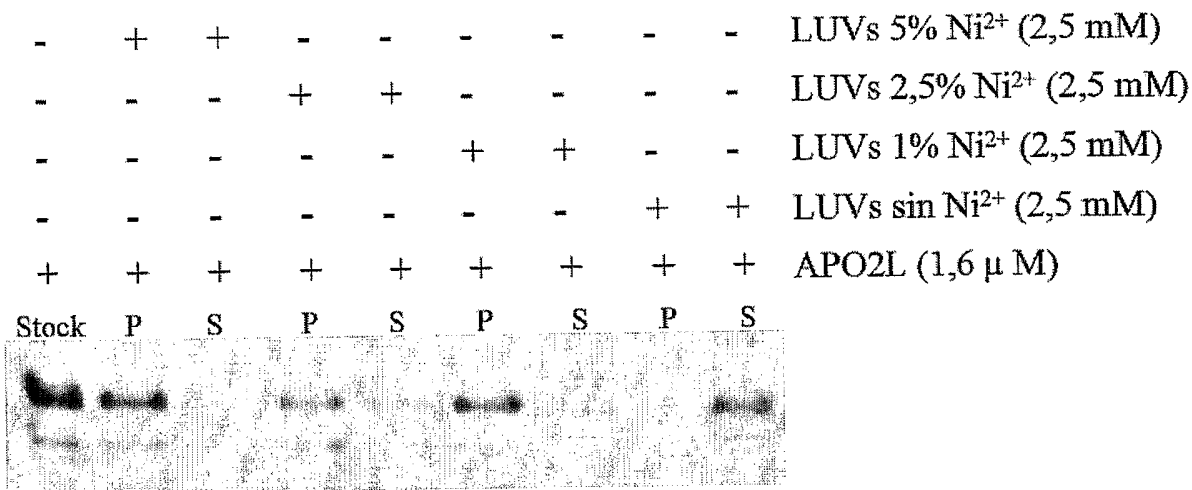


FIG.3



5

10

15

FIG.4

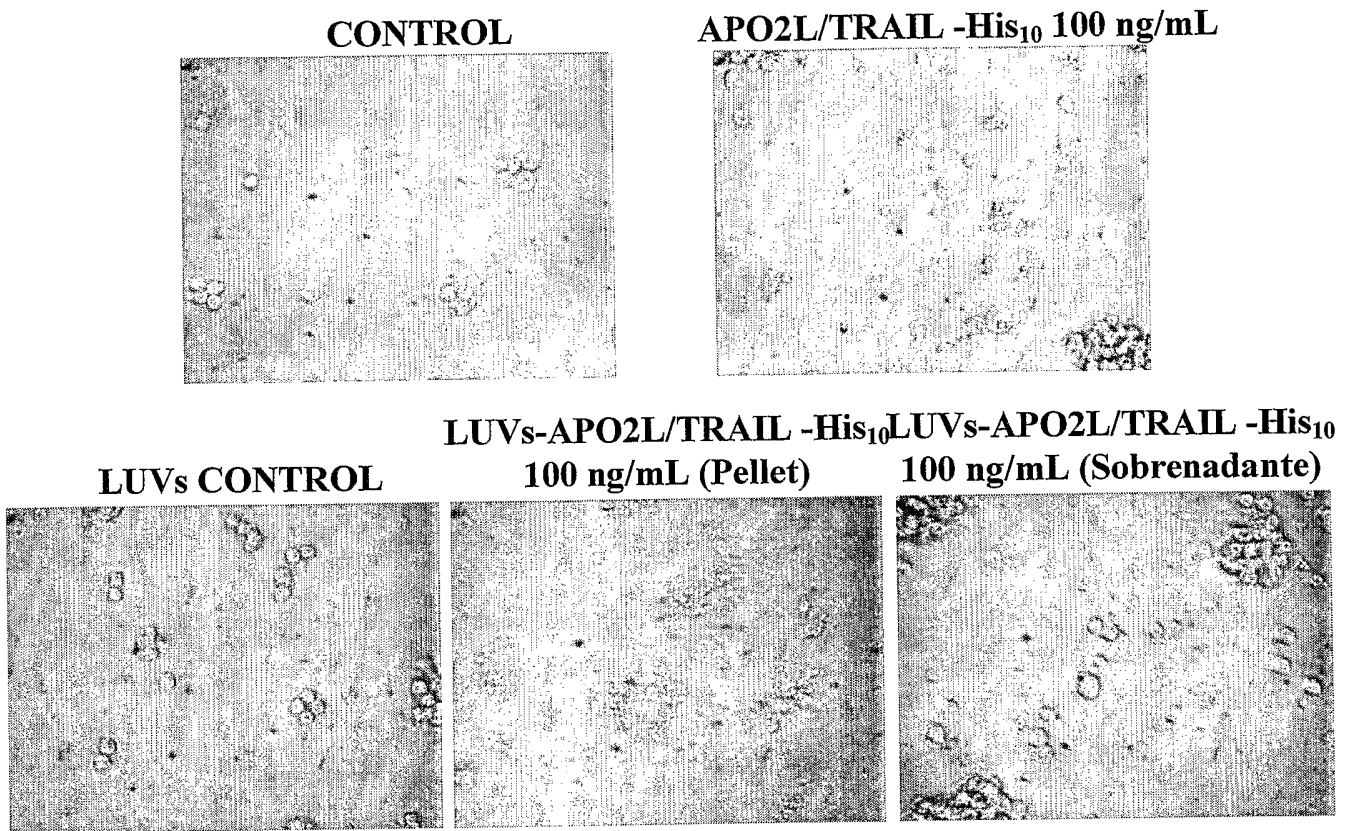


FIG.5

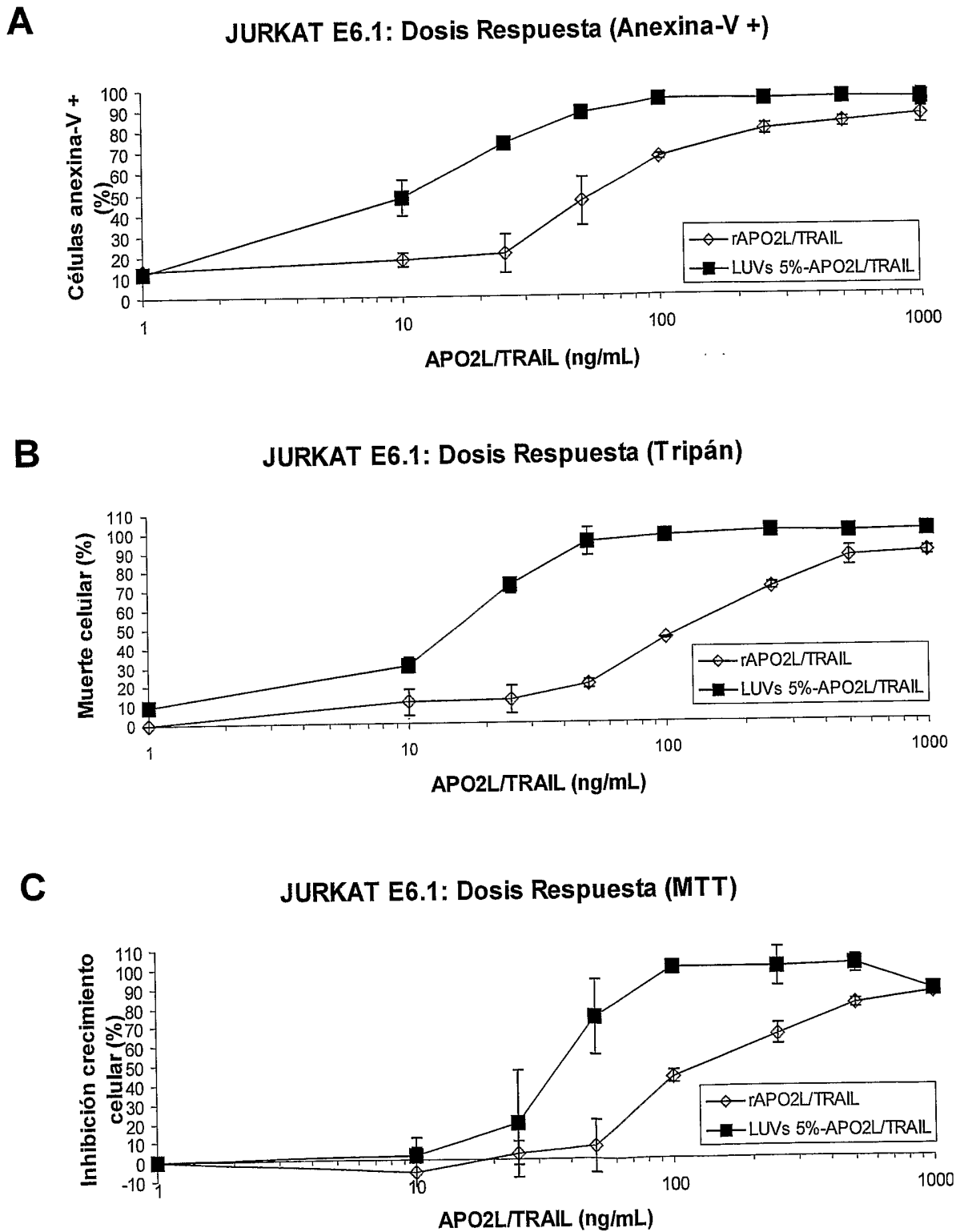
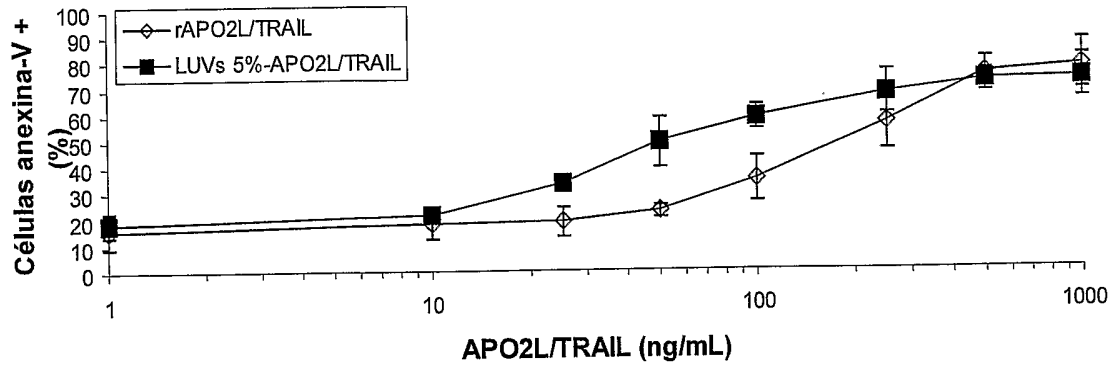


FIG.6

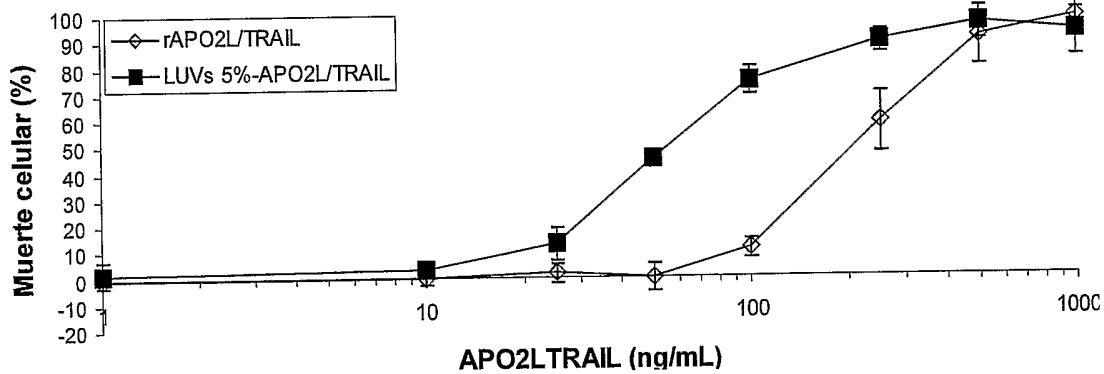
A

RPMI 8226: Dosis Respuesta (Anexina-V +)



B

RPMI 8226: Dosis Respuesta (Tripán)



C

RPMI 8226: Dosis Respuesta (MTT)

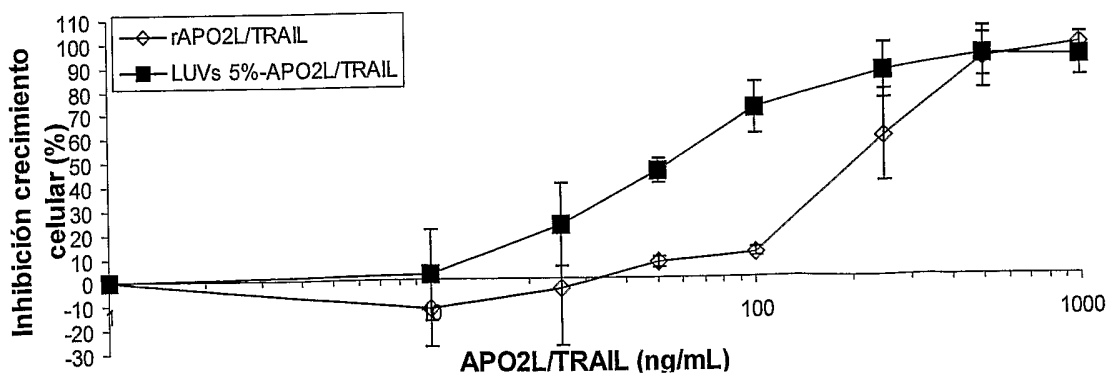


FIG.7

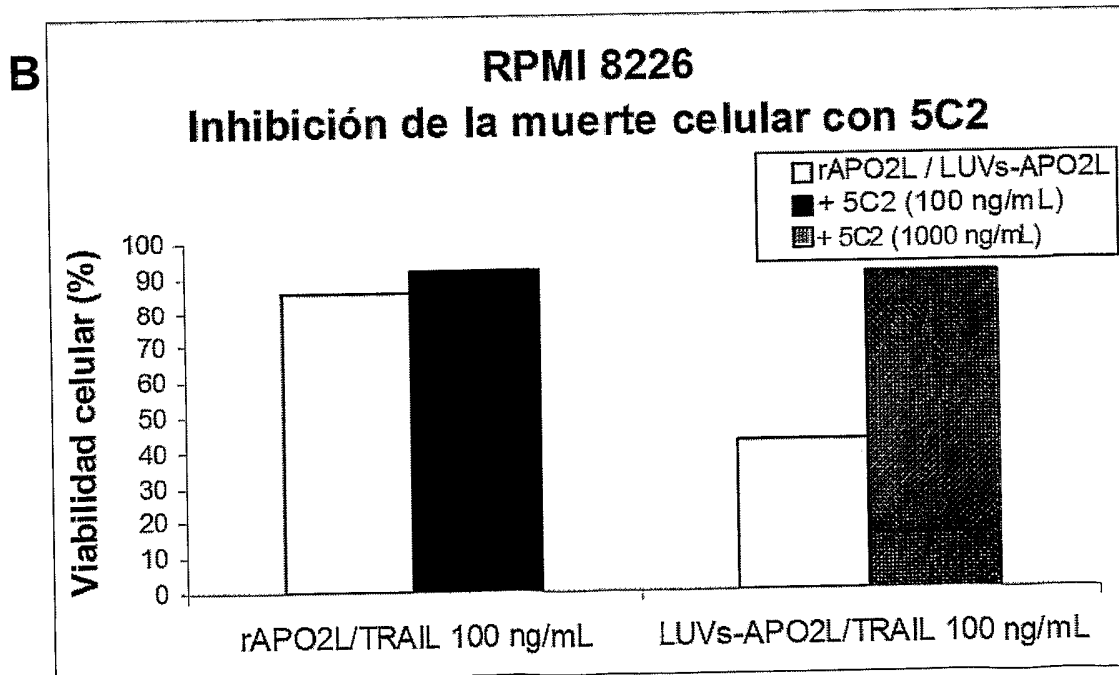
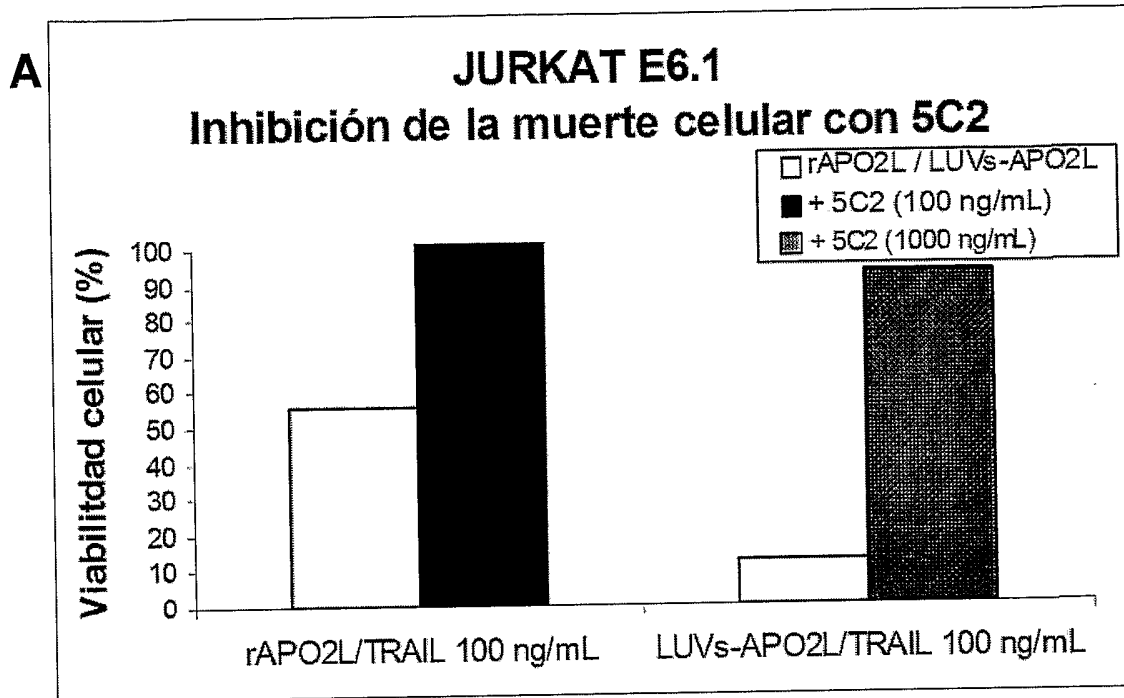
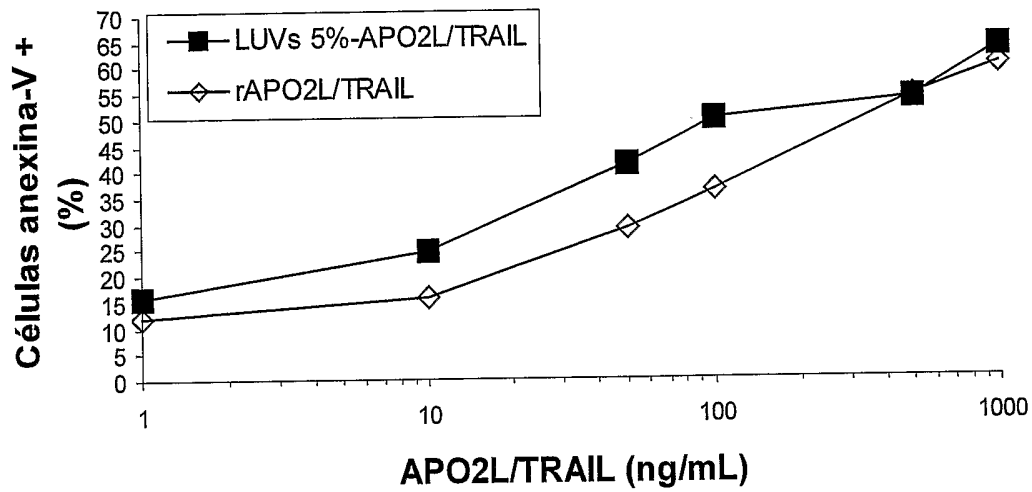


FIG.8

A U266: Dosis Respuesta (Anexina-V +)



B IM-9: Dosis Respuesta (Anexina-V +)

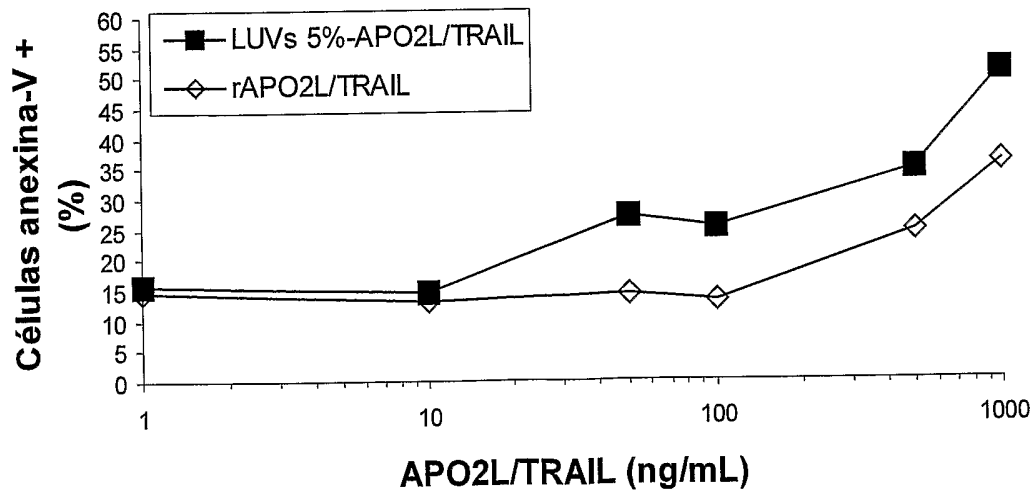
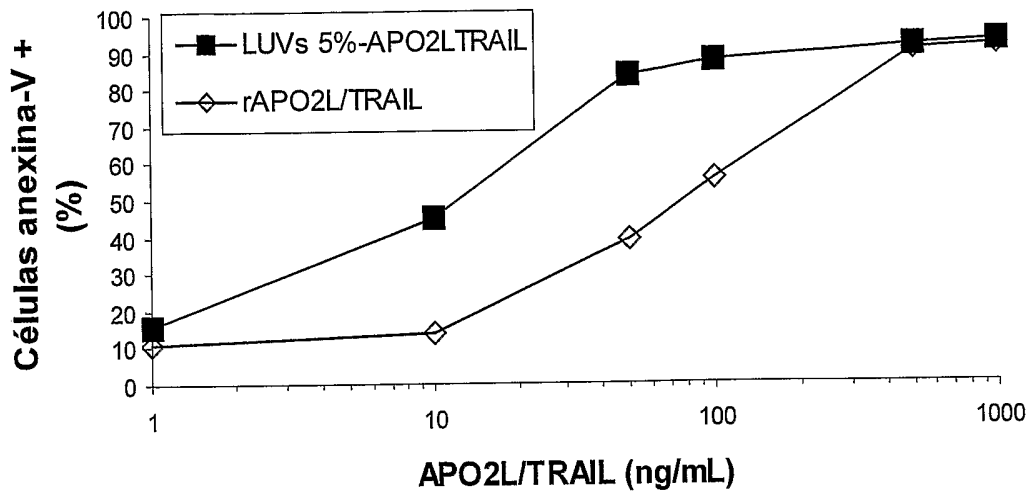


FIG.8

C MM1.S: Dosis Respuesta (Anexina-V +)



D A549: Dosis Respuesta (Anexina-V +)

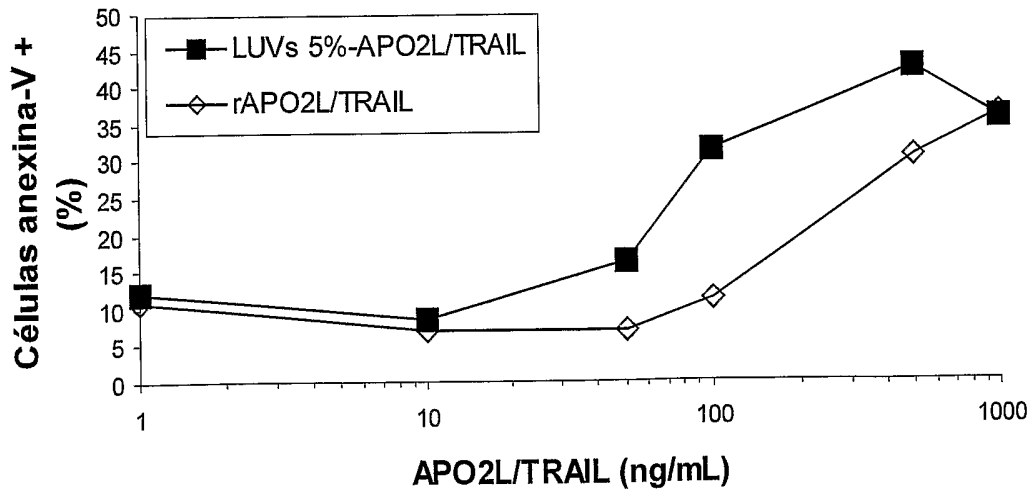
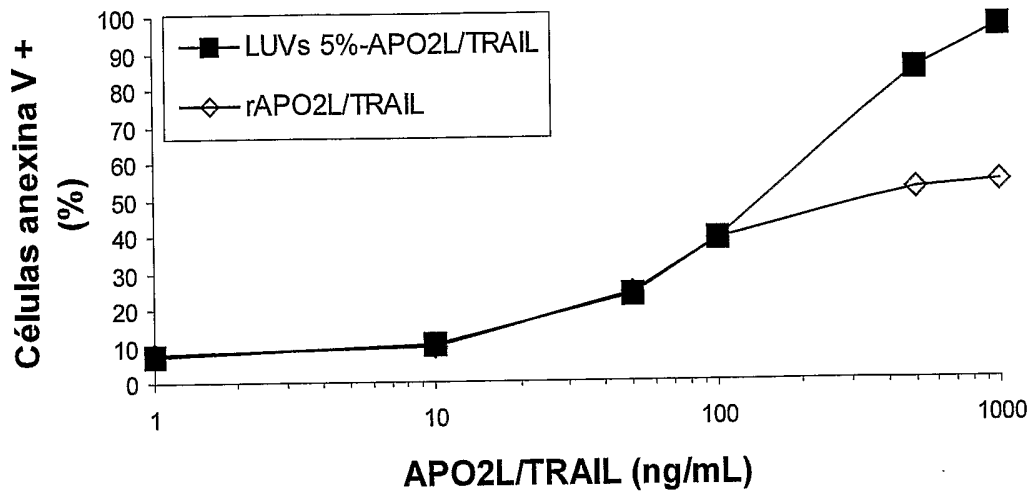
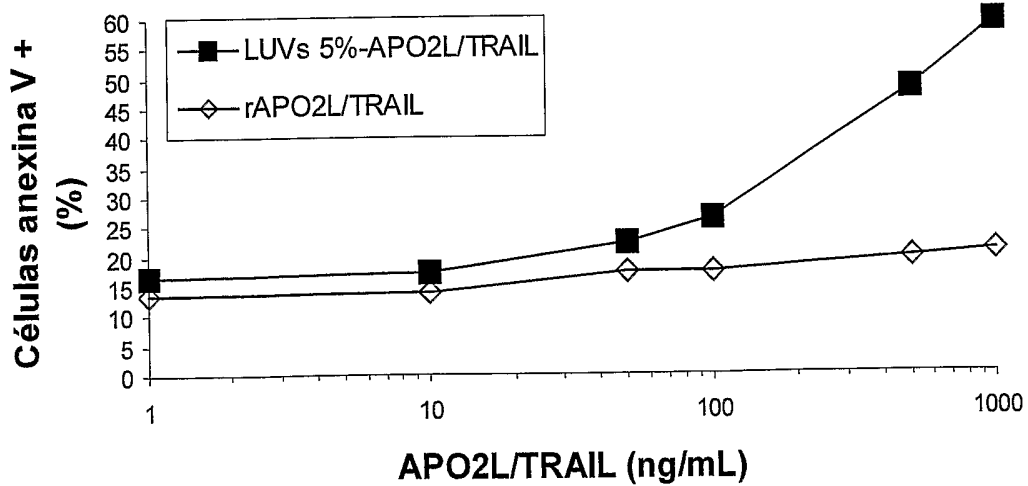


FIG.8

E U937: Dosis Respuesta (Anexina V +)



F U937-Bcl2: Dosis Respuesta (Anexina V +)



11/21

FIG.9

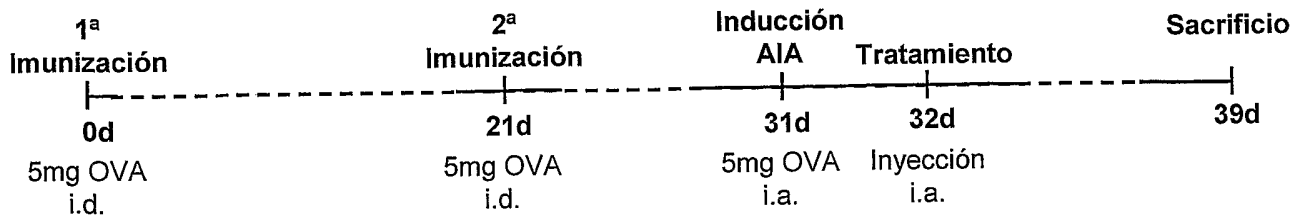
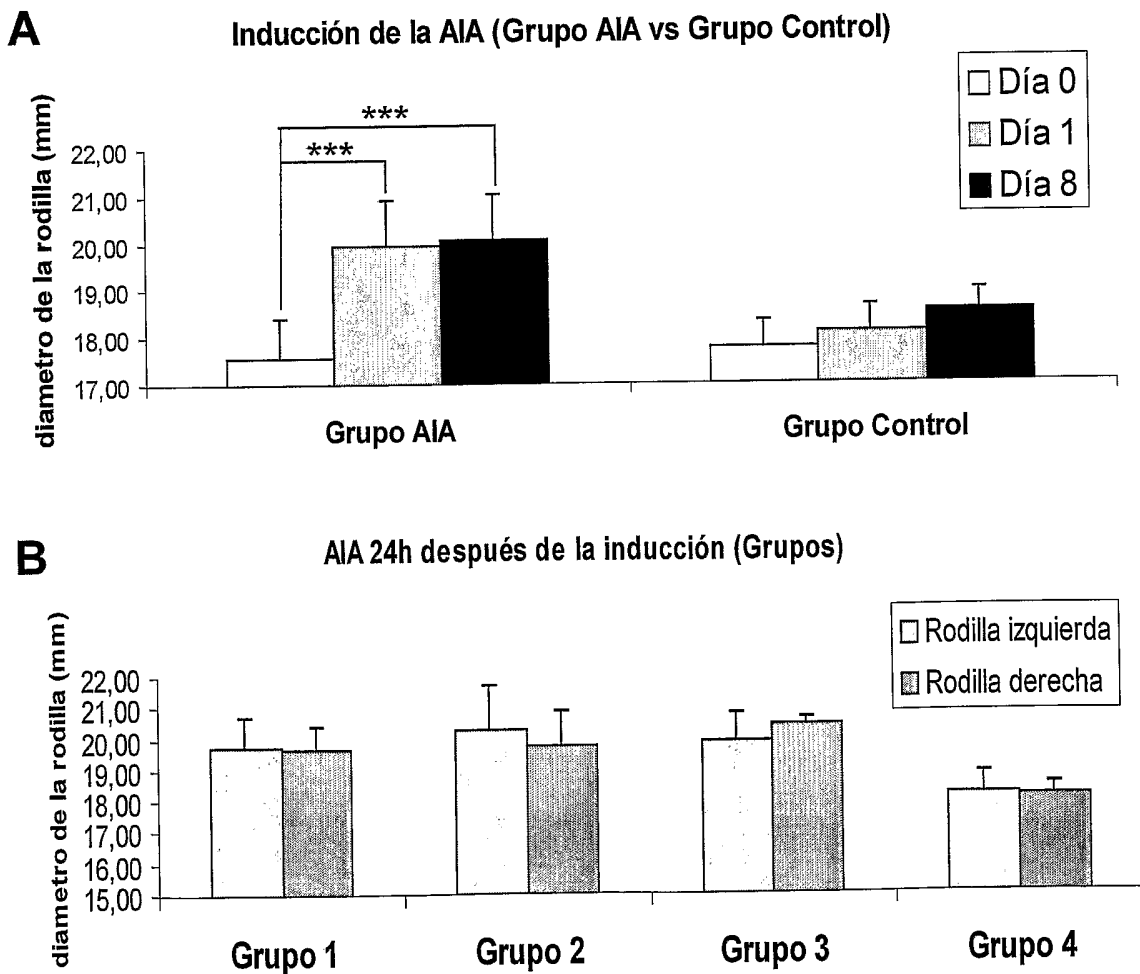


FIG.10



12/21

FIG.11

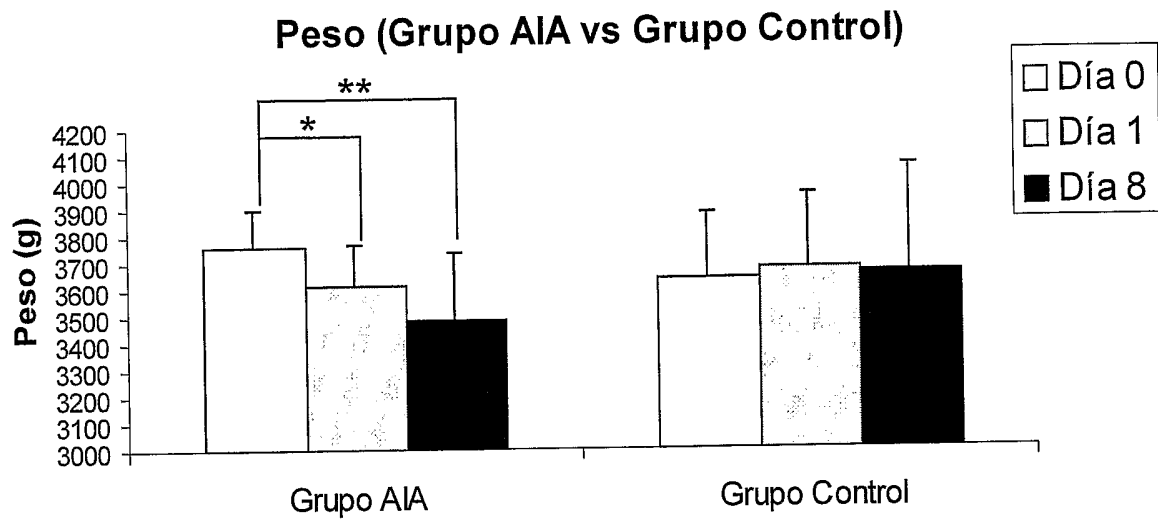


FIG.12

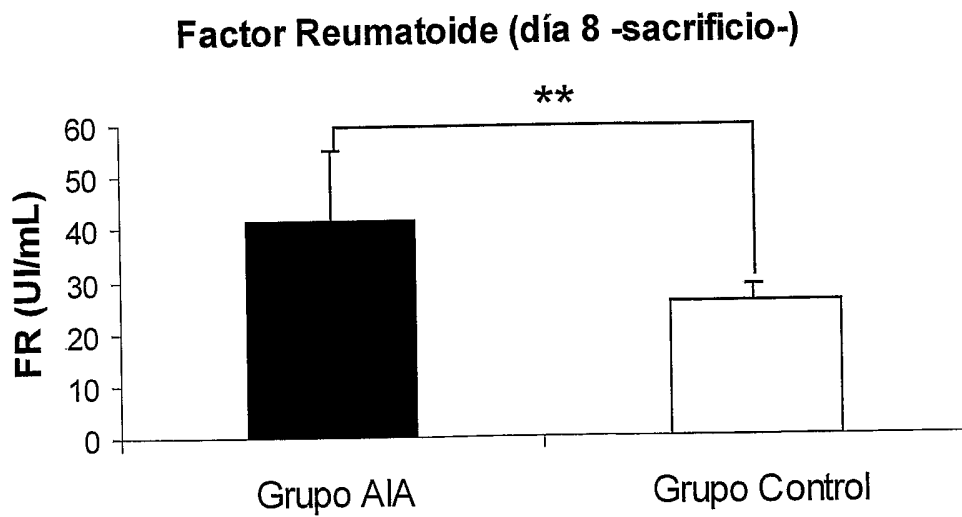


FIG.13

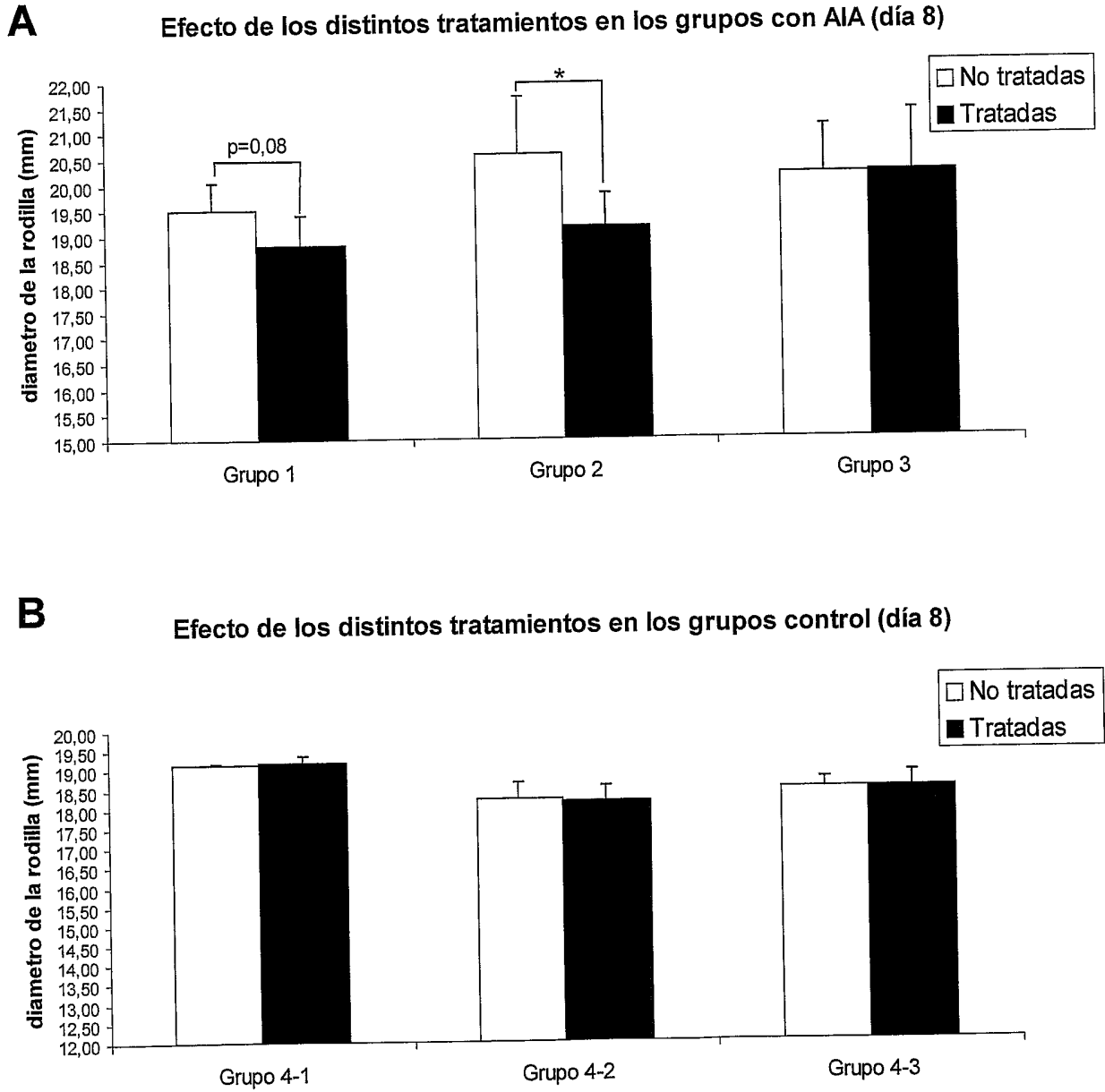
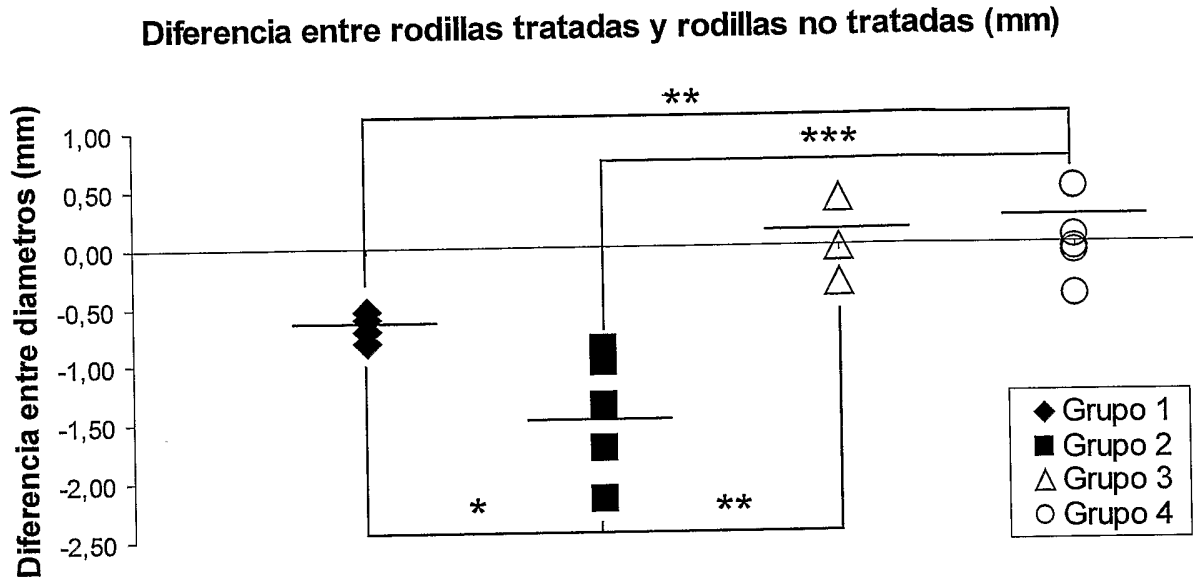


FIG.14



5

10

FIG.15

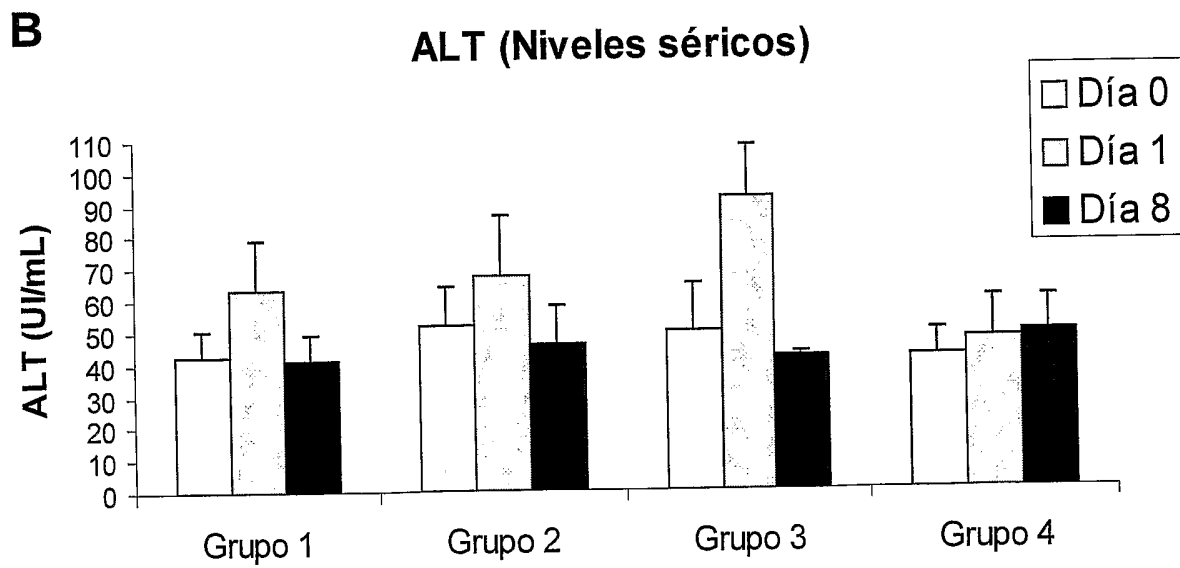
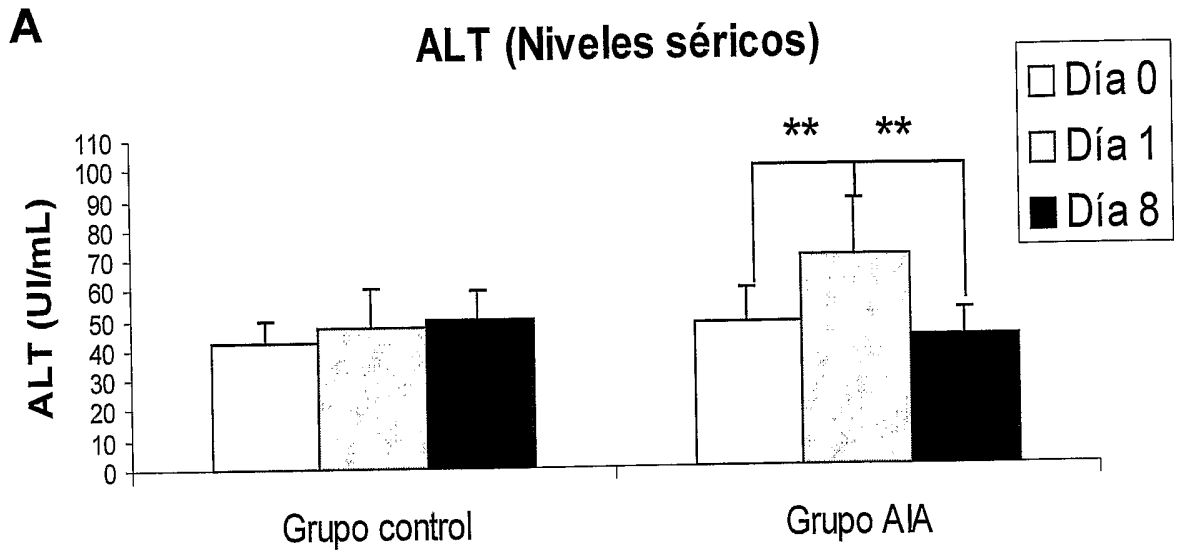
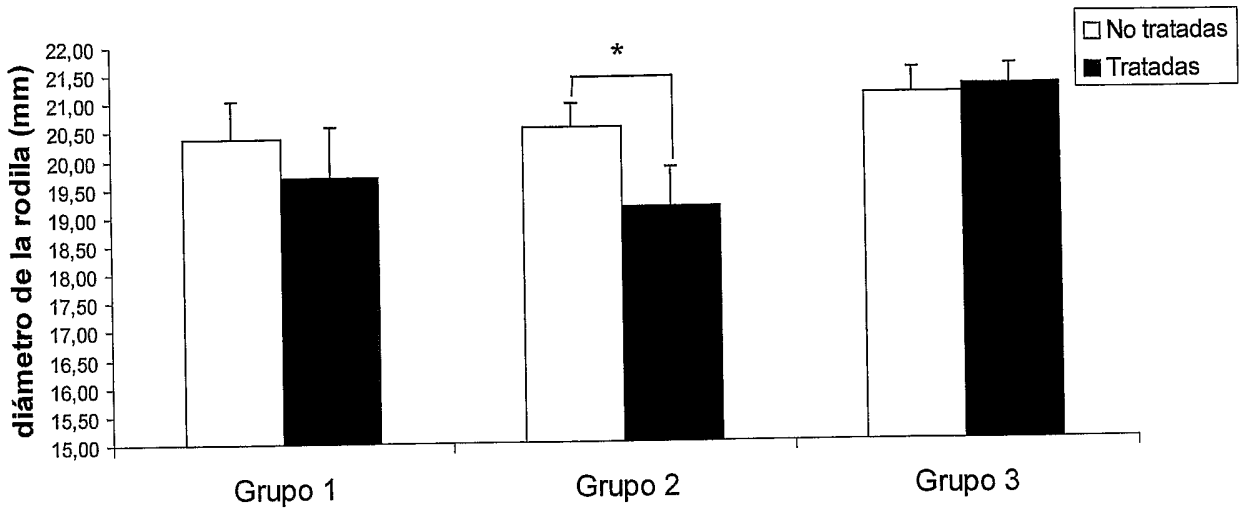


FIG.16

A

Efecto de los distintos tratamientos en los grupos con AIA (día 8)



B

Efecto de los distintos tratamientos en los grupos con AIA (día 8)

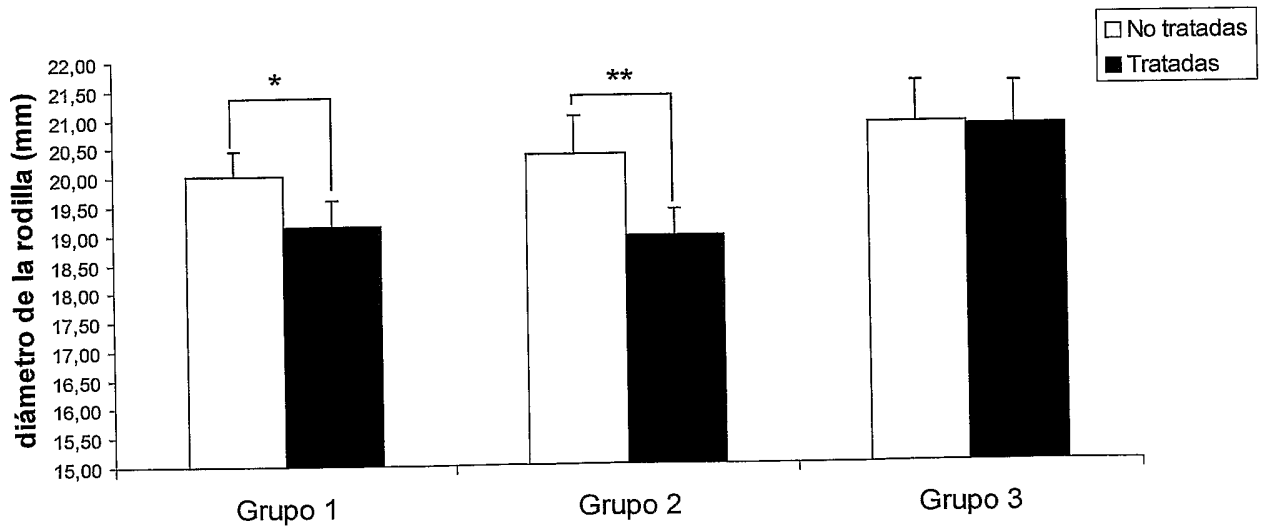


FIG.17

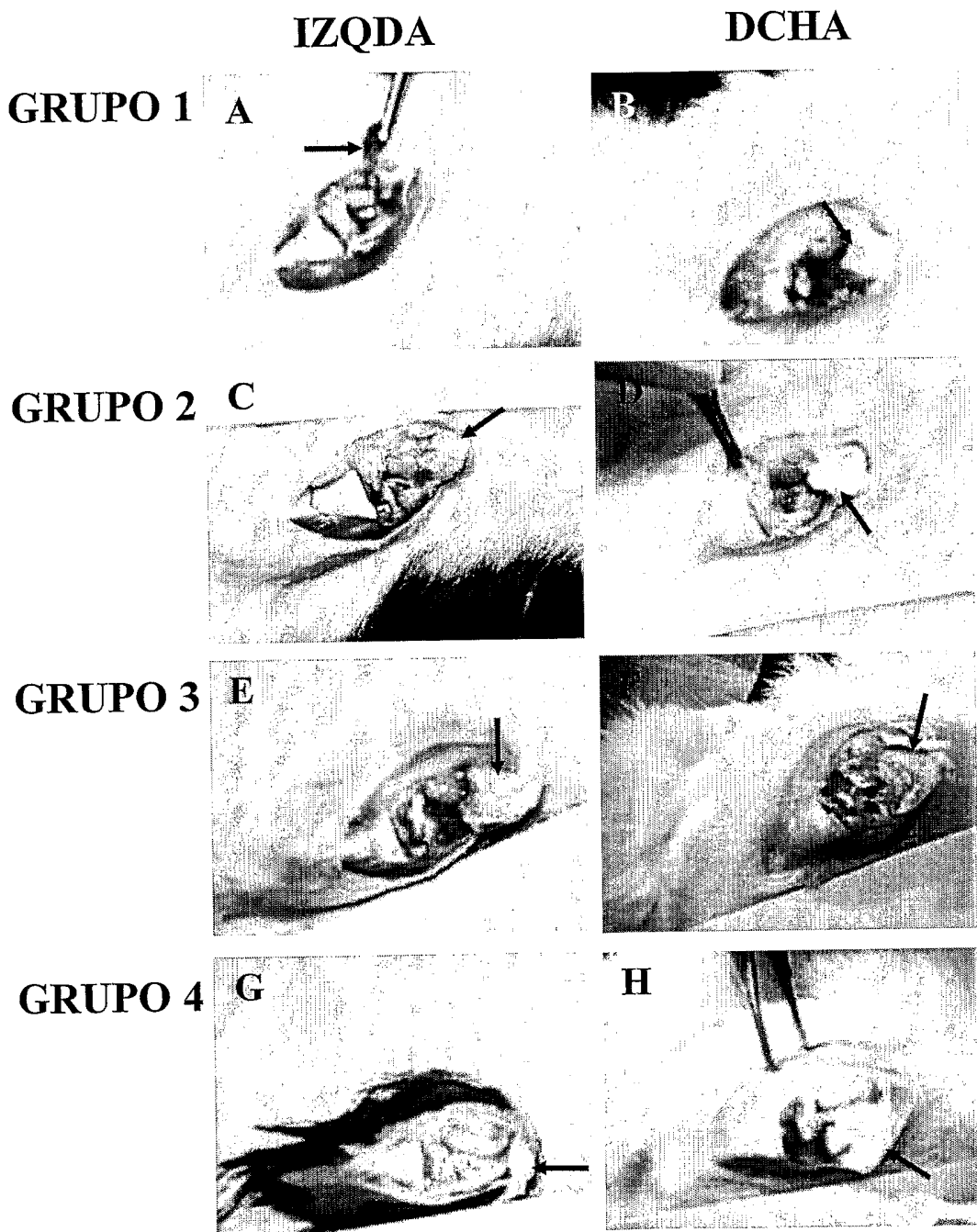
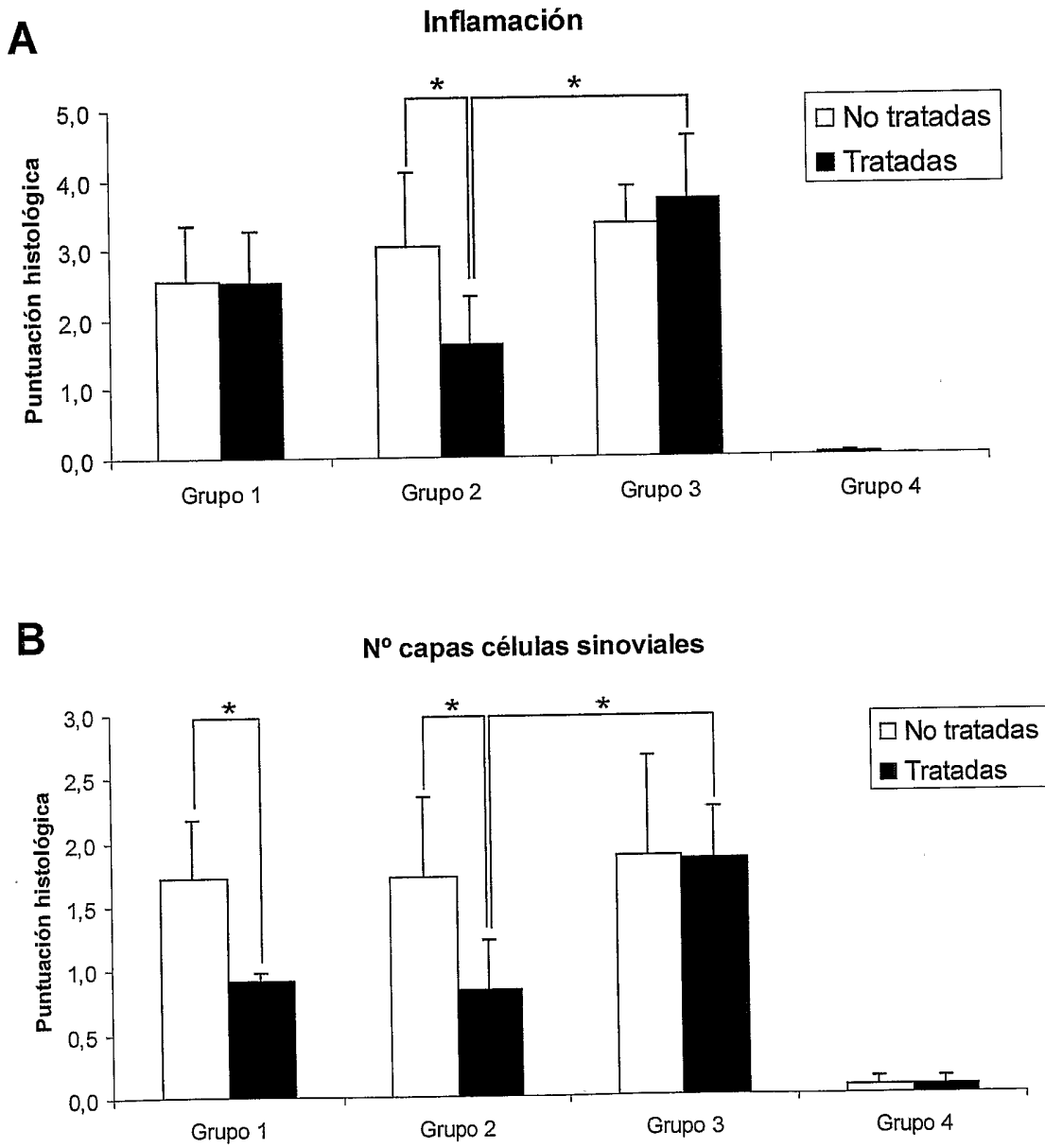


FIG.18



19/21

FIG.18

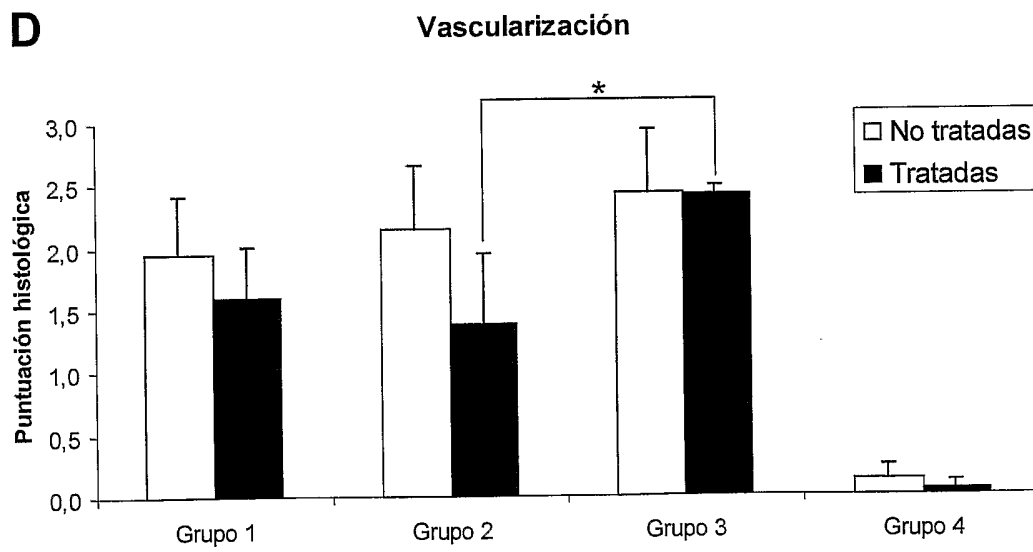
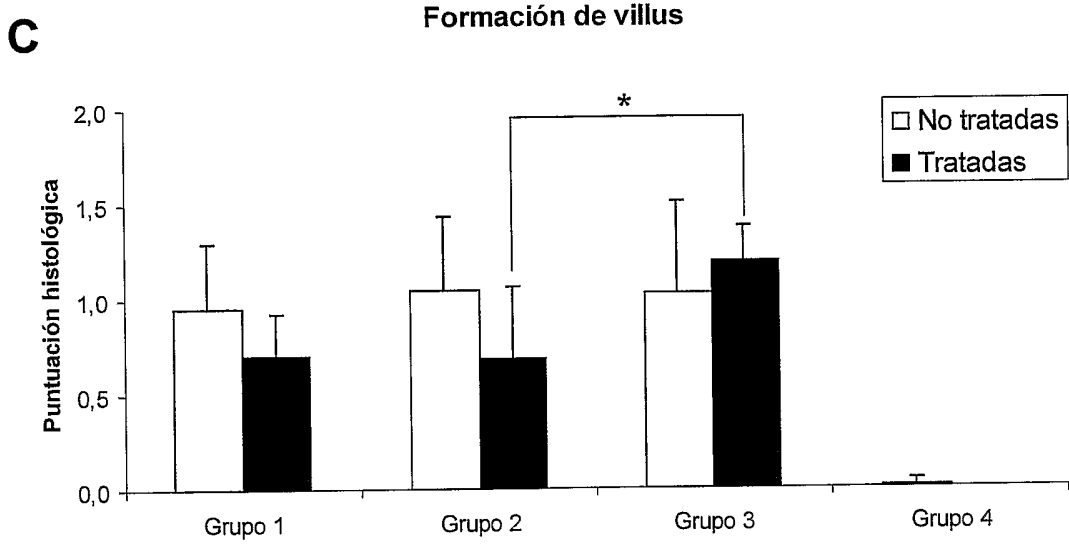


FIG.19

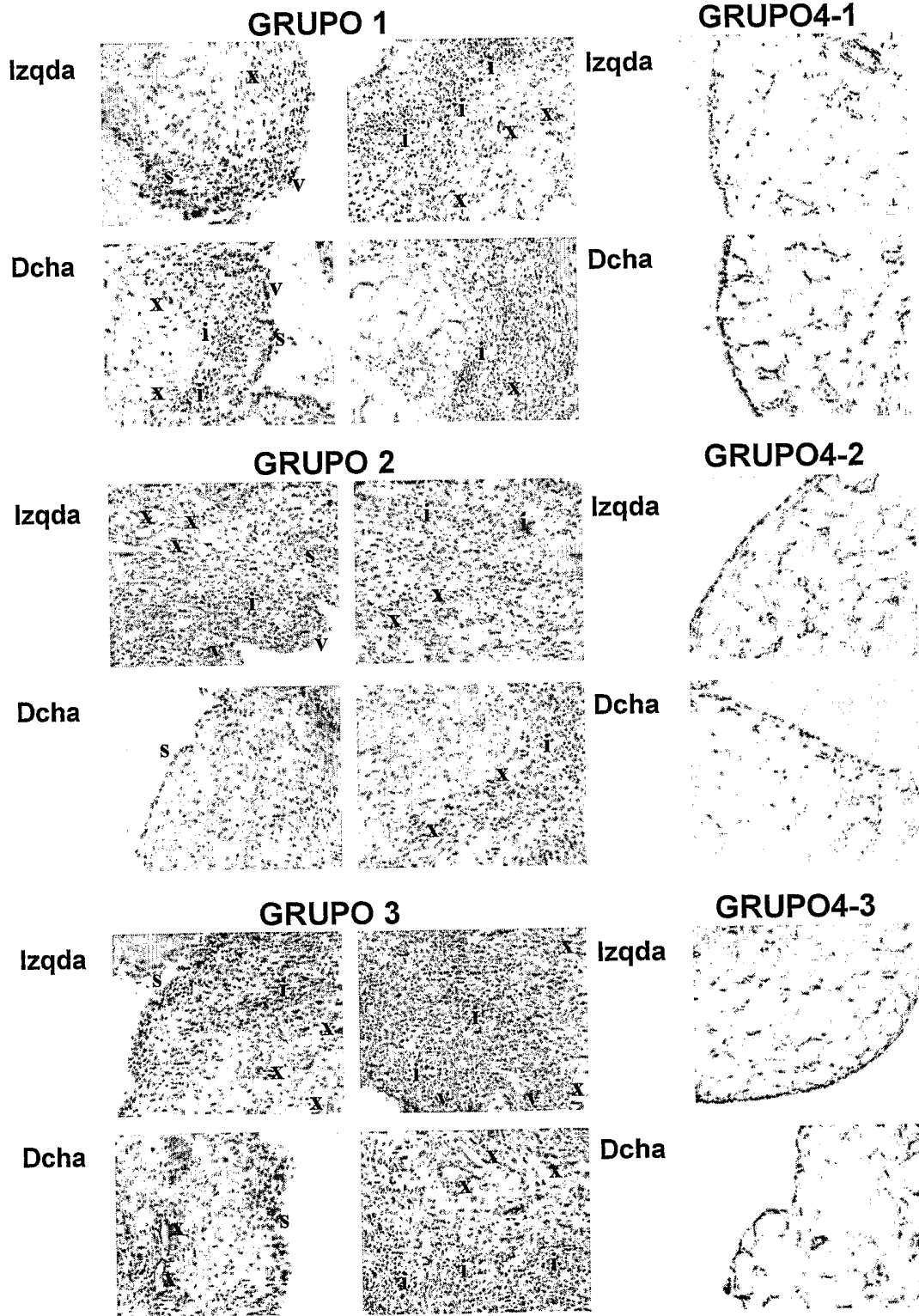
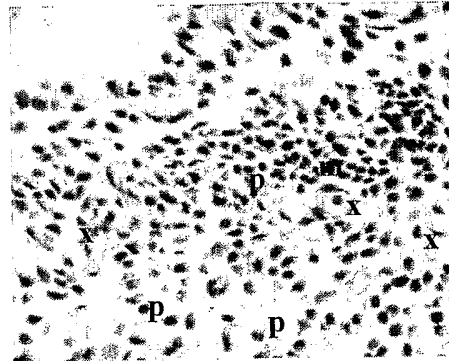
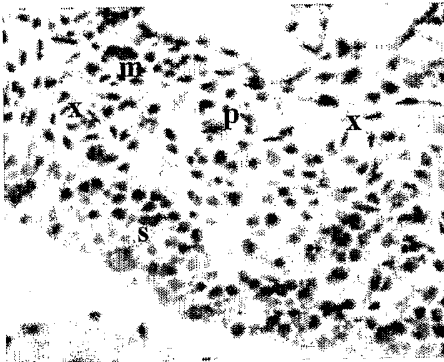


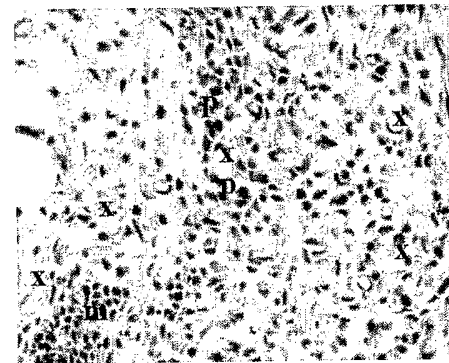
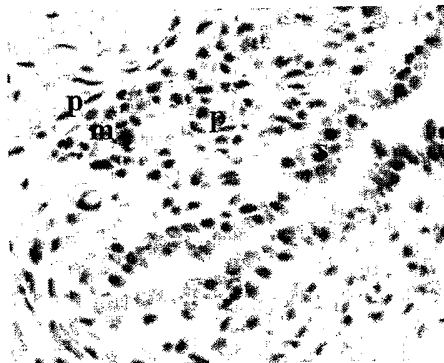
FIG.20

GRUPO 1

Izqda

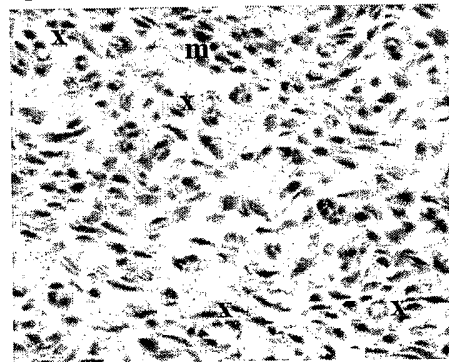
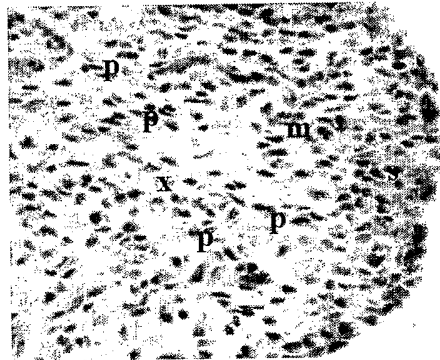


Dcha



GRUPO 2

Izqda



Dcha

