

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 117**

21 Número de solicitud: 201331533

51 Int. Cl.:

**A61K 31/337** (2006.01)

**A61K 31/30** (2006.01)

**A61K 31/122** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**17.10.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**20.05.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/070789**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (100.0%)**  
**Ctra. de Utrera, Km 1**  
**41013 SEVILLA ES**

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ ALCÁZAR, José A. ;**  
**OROPESA ÁVILA, Manuel;**  
**FERNÁNDEZ VEGA, Alejandro;**  
**GARRIDO MARAVER, Juan ;**  
**DE LA MATA FERNÁNDEZ, Mario;**  
**COTÁN MARÍN, David;**  
**DELGADO PAVÓN, Ana;**  
**PÉREZ CALERO, Carmen;**  
**VILLANUEVA PAZ, Marina;**  
**CORDERO MORALES, Mario D. y**  
**DE LAVERA CALDERÓN, Isabel**

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

54 Título: **COMPUESTOS ESTABILIZADORES DE CÉLULAS APOPTÓTICAS**

57 Resumen:

Compuestos estabilizadores de células apoptóticas.  
La presente invención se refiere a una composición para la estabilización de células apoptóticas que comprende Zinc, taxol y coenzima Q<sub>10</sub>, a un procedimiento para la estabilización de células apoptóticas y a un kit para llevar a cabo dicho procedimiento.

ES 2 536 117 A1

**DESCRIPCIÓN**

COMPUESTOS ESTABILIZADORES DE CÉLULAS APOPTÓTICAS.

**Campo de la invención**

La presente invención se encuadra en el campo general de la biología molecular y en particular se refiere a compuestos estabilizadores de células apoptóticas.

5 **Estado de la técnica**

La apoptosis es una vía de señalización intracelular conservada a través de la evolución dependiente de una cascada proteolítica mediada por caspasas, que conduce a una muerte celular programada mediante una serie de cambios celulares distintos de la necrosis celular. La apoptosis desempeña un papel fundamental en la remodelación tisular durante el desarrollo, la homeostasis tisular y la eliminación de las células senescentes o con daños genéticos severos. Dado que la necrosis celular provoca la liberación de moléculas tóxicas y causa inflamación, una función importante de la apoptosis es la de aislar células específicas y prepararlas para su posterior eliminación por fagocitosis.

15 El proceso apoptótico puede dividirse en tres fases funcionalmente distintas:

a) Inducción: cambios en el ambiente celular que resultan en la activación de los mecanismos apoptóticos intracelulares (entrada en la fase de ejecución),

b) Ejecución: procesos que resultan en la degradación de los componentes intracelulares

20 c) Fagocitosis: aquellos acontecimientos asociados con la eliminación de los restos celulares.

En contraste a las células apoptóticas *in vivo*, las células que realizan apoptosis *in vitro* no pueden ser eliminadas por los macrófagos y sufren un proceso tardío de necrosis secundaria que se define como la pérdida de la integridad de la membrana y la liberación del contenido celular en el espacio extracelular.

La necrosis secundaria *in vivo* tendrá lugar en las deficiencias de macrófagos y/o la saturación del sistema inmunitario como en la inflamación crónica o en la muerte masiva por tóxicos. La fase de ejecución de la apoptosis dura aproximadamente una hora y se caracteriza por alteraciones morfológicas características: retraimiento celular, “blebbing” de la membrana plasmática, condensación de la cromatina, y fragmentación celular y del ADN.

Para permitir estos dramáticos cambios morfológicos que acompañan la fase de ejecución de la apoptosis, la célula apoptótica realiza una serie de profundos cambios (roturas y reorganizaciones) en el citoesqueleto celular.

5 Experimentos previos han demostrado que el citoesqueleto de actinmiosina desempeña un papel fundamental en la remodelación celular durante los fenómenos tempranos de la fase de ejecución de la apoptosis, mientras los microtúbulos y filamentos intermedios son desorganizados. No obstante en *Sanchez-Alcazar et al, 2007. The apoptotic microtubule network preserves plasma membrane integrity during the execution phase of apoptosis. Apoptosis. 12:1195-1208*; se ha demostrado que el  
10 citoesqueleto de microtúbulos se reorganiza durante la fase de ejecución de la apoptosis formando una red de microtúbulos apoptóticos (AMN, del inglés Apoptotic Microtubule Network). La AMN se asocia estrechamente a la membrana plasmática, formando un anillo cortical o “capullo” celular. Concomitantemente, otros componentes del citoesqueleto, como los filamentos de actina y los filamentos intermedios se  
15 desorganizan.

La formación de la AMN en la fase de ejecución de la apoptosis ocurre en todas las líneas celulares estudiadas (H460, HeLa, fibroblastos humanos primarios, y LLCPK-1alfa, células Kc de *Drosophila*), y en respuesta a una amplia variedad de inductores apoptóticos como la camptotecina (CPT), la estaurosporina, TRAIL y la retirada del  
20 suero.

La AMN desempeña un papel fundamental para mantener la integridad de la membrana plasmática y la morfología celular durante la fase de ejecución de la apoptosis, *Oropesa-Avila, M., et al. 2013. Apoptotic microtubules delimit an active caspase free area in the cellular cortex during the execution phase of apoptosis. 23 Cell death & disease. 4:e527*. La disrupción de la AMN tiene como consecuencia que  
25 las células apoptóticas entren en necrosis secundaria, se liberen moléculas tóxicas, y puedan por tanto afectarse las células vecinas. Por consiguiente, la correcta formación de la AMN y su mantenimiento durante la apoptosis es un fenómeno esencial para que las células apoptóticas mantengan su principal característica que es la de preservar su  
30 permeabilidad hasta que sean fagocitadas por los macrófagos.

Actualmente las células apoptóticas juegan un papel importante en la biomedicina ya que debido a sus características, están siendo ampliamente utilizadas para evaluar los efectos citotóxicos de diferentes compuestos mediante la cuantificación de las células

apoptóticas. Sin embargo, esta determinación se ve a menudo afectada porque en el proceso de manipulación de las células muchas de ellas entran en necrosis secundaria y por lo tanto las cuantificaciones no son exactas. Por ello la estabilización de las células apoptóticas permitirá una cuantificación más exacta del número real de células en apoptosis o de parámetros bioquímicos o morfológicos característicos de estas células (potencial de membrana mitocondrial, actividad de las caspasas...etc).

La estabilización de las células apoptóticas y el retraso en su entrada en necrosis secundaria también es importante para evitar los fenómenos tóxicos y pro-inflamatorios inducidos por la muerte celular. De esta forma la estabilización de las células apoptóticas puede ser un mecanismo protector para aminorar los efectos secundarios derivados de tratamientos que busquen la muerte celular (terapia anticancerosa).

Las células apoptóticas son utilizadas para diversas formas de terapia, fundamentalmente con el objetivo de desarrollar inmunotolerancia en los individuos receptores. La estabilización de las células apoptóticas mediante la presente invención garantizará que las células apoptóticas inoculadas retengan sus típicas características hasta ser fagocitadas por los macrófagos.

Las células apoptóticas estabilizadas son utilizadas para el transporte de sustancias terapéuticas como proteínas con el objetivo de inducir inmunotolerancia o terapia de reemplazo proteico.

Hay formas de muerte que por sus características dificultan la formación de la AMN (tóxicos, frío...) imposibilitando por tanto que las células apoptóticas tengan sus características esenciales y provocando graves efectos secundarios.

La estabilización de las células apoptóticas mediante la presente invención puede permitir el desarrollo de terapias que ayuden a una correcta formación y estabilización de la AMN y por lo tanto a la inducción de un tipo de muerte más fisiológico y controlado por el organismo.

En base a lo expuesto anteriormente, existe pues una necesidad de proporcionar compuestos y métodos de estabilización de las células apoptóticas.

### **Breve descripción de la invención.**

La presente invención soluciona el problema anteriormente planteado ya que proporciona compuestos que estabilizan las células apoptóticas.

Así pues en un primer aspecto la presente invención se refiere a una composición para la estabilización de células apoptóticas (de ahora en adelante, composición de la presente invención) caracterizado por que comprende al menos uno de los siguientes compuestos: agente estabilizador de microtúbulos, agente inhibidor de caspasas y/o agente protector de membrana.

Preferentemente, el agente estabilizador de microtúbulos de la composición de la presente invención es el taxol.

Preferentemente el agente inhibidor de caspasas es seleccionado de entre el Z-VAD y el Zinc. Preferentemente Zinc.

10 Preferentemente el agente protector de membrana es el coenzima Q<sub>10</sub>.

En una realización en particular, la composición de la presente invención comprende Zinc.

En otra realización en particular, la composición de la presente invención comprende Zinc y taxol.

15 En otra realización en particular, la composición de la presente invención comprende Zinc, taxol y coenzima Q<sub>10</sub>.

En una realización en particular, el Zinc se encuentra en una concentración comprendida entre 0,1-500 µMolar.

20 En una realización en particular el taxol se encuentra en una concentración comprendida entre 0,1-100 µMolar.

En una realización en particular, el coenzima Q<sub>10</sub> se encuentra en una concentración comprendida entre 0,1-500 µMolar.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la estabilización de células apoptóticas (de ahora en adelante, procedimiento de la presente invención) que comprende los siguientes pasos:

a) añadir a un cultivo de células apoptóticas un agente estabilizador de microtúbulos, agente inhibidor de caspasas y/o agente protector de membrana.

En una realización en particular al cultivo de células apoptóticas se añade Zinc, taxol y/o coenzima Q<sub>10</sub>.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la estabilización de células apoptóticas (de ahora en adelante kit de la presente invención) según el procedimiento de la presente invención y que comprende un estabilizador de microtúbulos, un agente inhibidor de caspasas y/o agente protector de membrana. En particular comprende zinc, taxol y/o coenzima Q<sub>10</sub>.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del kit de la presente invención para la estabilización de células apoptóticas.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al zinc, taxol y/o coenzima Q<sub>10</sub> para su uso como agentes estabilizadores de células apoptóticas.

#### 10 **Descripción de las figuras**

Figura 1: muestra la cuantificación de células apoptóticas mediante microscopía tras 72 horas de incubación en ausencia y presencia de taxol 1 μM y zinc++ 50 μM o taxol 1 μM, zinc++ 50 μM y coenzima CoQ<sub>10</sub> (Q) 50 μM. Las flechas indican las condiciones óptimas con diferencias significativas, p<0.05

15 Figura 2: Cuantificación de la liberación de LDH (una medida de las células que entran en necrosis) en cultivos de células apoptóticas tras 72 horas de incubación en ausencia y presencia de taxol 1 μM y zinc++ 50 μM o taxol 1 μM, zinc++ 50 μM y coenzima CoQ<sub>10</sub> (Q) 50 μM. Las flechas indican las condiciones óptimas con diferencias significativas, p<0.05.

20 Figura 3. Cuantificación de la apoptosis en cultivos de células apoptóticas H460 tras 48 horas de incubación con CPT y citocalasina las últimas 24 horas. Antes de su recogida de las placas de cultivo para su determinación por citometría de flujo mediante el marcaje con Anexina y 7-ADD, las células apoptóticas fueron incubadas 10 minutos en presencia o ausencia de taxol 1 μM, zinc++ 50 μM y coenzima CoQ<sub>10</sub> 25 50 μM. A continuación fueron recogidas y teñidas con Annexin-V-FITC y 7-ADD y las distintas poblaciones de células: viables, apoptóticas, necróticas primarias y necróticas secundarias fueron analizadas en el citómetro de flujo. a) Células sin tratar, b) células tratadas, c) gráfica

Figura 4. Cuantificación de la apoptosis en cultivos de células H460 tras 48 horas de incubación con CPT y citocalasina las últimas 24 horas. Finalizada la incubación los cultivos son expuestos a 8° C durante una 1 hora y posteriormente incubados a 37° C durante 2 horas. Antes de su exposición a 8°C las células fueron incubadas 10

minutos en presencia o ausencia de taxol 1  $\mu\text{M}$ , zinc<sup>++</sup> 50  $\mu\text{M}$  y coenzima CoQ10 50  $\mu\text{M}$ . A continuación fueron recogidas y teñidas con Anexin-V-FITC y PI y las distintas poblaciones de células: viables, apoptóticas, necróticas primarias y necróticas secundarias fueron analizadas en el citómetro de flujo. a) Células sin tratar, b) células sin tratar y expuestas a frío, c) células tratadas y expuestas a frío, d) gráfica

### Descripción detallada de la invención

*Ejemplo 1: Estabilización y preservación temporal de células en apoptosis mediante agentes estabilizantes de los microtúbulos, inhibidores de las caspasas y antioxidantes.*

Con el objetivo de conseguir la estabilización de las células apoptóticas para su detección diagnóstica o utilización para fines terapéuticos, en primer lugar indujimos una población homogénea de células apoptóticas en las células H460 mediante el tratamiento con camptotecina (CPT) 10  $\mu\text{M}$  durante un período aproximado de 48h. A las 24h de tratamiento con CPT, las células fueron incubadas con citocalasina (2  $\mu\text{M}$ ) hasta el final de la incubación. Con este protocolo obtenemos una población sincronizada de células apoptóticas. Posteriormente y para conseguir la estabilización de las células apoptóticas las incubamos con distintos agentes o combinaciones de ellos:

a) agentes estabilizantes de microtúbulos como el taxol para evitar la despolimerización de la AMN

b) agentes inhibidores de las caspasas como el Z-VAD o el Zinc<sup>++</sup>

c) agentes antioxidantes protectores de membranas como el coenzima CoQ10

Los resultados (Figura 1 y 2,) demostraron que la combinación de taxol 1  $\mu\text{M}$  y zinc<sup>++</sup> 50  $\mu\text{M}$  o taxol 1  $\mu\text{M}$ , zinc<sup>++</sup> 50  $\mu\text{M}$  y coenzima CoQ10 50  $\mu\text{M}$  produjo la mejor estabilización de las células apoptóticas (mantenimiento morfológico y permeabilidad de la membrana plasmática) en un tiempo mínimo de 72 horas, que consideramos suficiente para su utilización diagnóstica o terapéutica.

A continuación se procedió a la cuantificación mediante citometría de flujo de células apoptóticas con estabilización mediante tinción con anexina-FITC y 7-Aminoactinomicina (7-AAD) o ioduro de propidio (PI). Para ello las células fueron cultivadas y tratadas según requerimientos específicos de cada una. A continuación se añadió el estabilizador (Taxol 10  $\mu\text{M}$  + SO<sub>4</sub>Zn 50  $\mu\text{M}$  + 50  $\mu\text{M}$  de CoQ10) y se

incubaron durante 10 minutos a 37°C en incubador y atmósfera de CO<sub>2</sub>. Una vez finalizada la estabilización, se añadió 7-AAD o PI, a una concentración de 1 µg/ml. se incubó durante 5 min, e inmediatamente, se retiró el medio y se añadió medio fresco a 37°C. Se incubó durante 10 minutos a 37°C en incubador y atmósfera de CO<sub>2</sub> y se procedió al lavado con PBS. A continuación se procedió al despegado con tripsina y posterior centrifugación a 600-900 g durante 3-5 minutos.

Se descartó el sobrenadante y se añadió 200 µl de buffer de Annexin para lavar. Se descartó de nuevo el sobrenadante y se resuspendió de nuevo con 300 µl de buffer de Annexin. Después se procedió con la citometría, ajustando los rangos de Ex/Em de ambos fluorocromos (Annexin V-FITC y 7-ADD o PI). Como se puede observar en la figura 3, los resultados muestran que las células apoptóticas tratadas con taxol 1 µM, zinc<sup>++</sup> 50 µM y coenzima CoQ10 50 µM producen una estabilización de las mismas.

Se realizó el mismo protocolo anterior, pero una vez finalizada la incubación, los cultivos fueron expuestos a 8° C durante una 1 hora y posteriormente incubados a 37°C durante 2 horas. Los resultados (figura 4) mostraron que con taxol 1 µM, zinc<sup>++</sup> 50 µM y coenzima CoQ10 50 µM se protege a las células apoptóticas de la exposición de una hora a bajas temperaturas (8°C).



## REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende un agente inhibidor de caspasas seleccionado de entre el Z-VAD y el Zinc para la estabilización de células apoptóticas en cultivos in vitro.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que además comprende taxol.
3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizado por que además comprende coenzima Q<sub>10</sub>.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado por que el Zinc se encuentra en una concentración comprendida entre 0,1-500 µMolar.
- 10 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado por que el taxol se encuentra en una concentración comprendida entre 0,1-100 µMolar.
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado por que el coenzima Q<sub>10</sub> se encuentra en una concentración comprendida entre 0,1-500 µMolar.
7. Uso de una composición que comprende un agente inhibidor de caspasas seleccionado de entre el Z-VAD y el Zinc para la fabricación de un medicamento para la estabilización de células apoptóticas en cultivos in vitro.
- 15 8. Uso según la reivindicación 7, caracterizado por que además comprende taxol.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, caracterizado por que además comprende coenzima Q<sub>10</sub>.
- 20 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, caracterizado por que el Zinc se encuentra en una concentración comprendida entre 0,1-500 µMolar.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-10, caracterizado por que el taxol se encuentra en una concentración comprendida entre 0,1-100 µMolar.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizado por que el coenzima Q<sub>10</sub> se encuentra en una concentración comprendida entre 0,1-500 µMolar.
- 25 13. Procedimiento para la estabilización de células apoptóticas que comprende añadir a un cultivo de células apoptóticas una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
14. Kit para la estabilización de células apoptóticas según el procedimiento de la reivindicación 7, caracterizado por que comprende zinc, taxol y/o coenzima Q<sub>10</sub>.
- 30

15. Uso del kit según la reivindicación 14, para la estabilización de células apoptóticas en cultivos celulares.

16. Zinc, taxol y/o coenzima Q<sub>10</sub> para su uso como agentes estabilizadores de células apoptóticas en cultivos celulares.

5 17. Uso de Zinc, taxol y/o coenzima Q<sub>10</sub> para su uso en la fabricación de un medicamento para la estabilización de células apoptóticas.

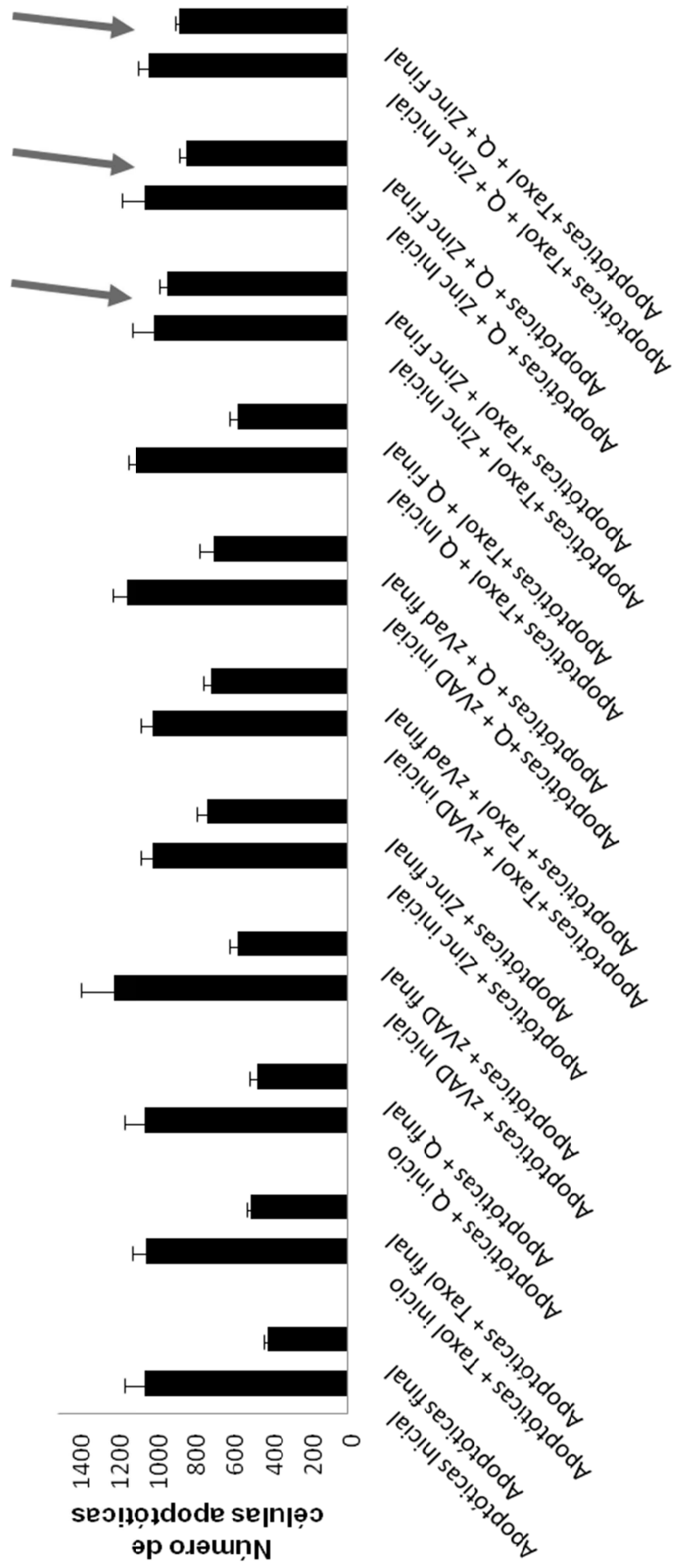


FIG. 1

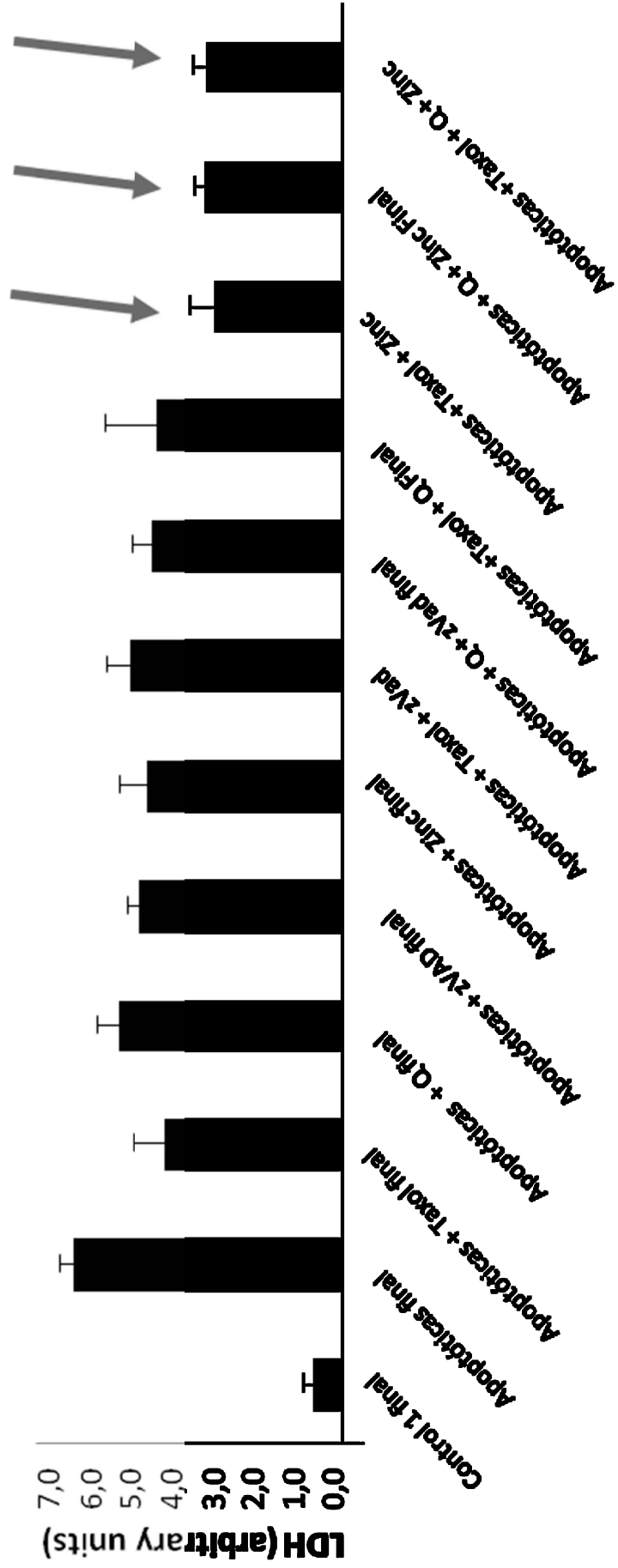
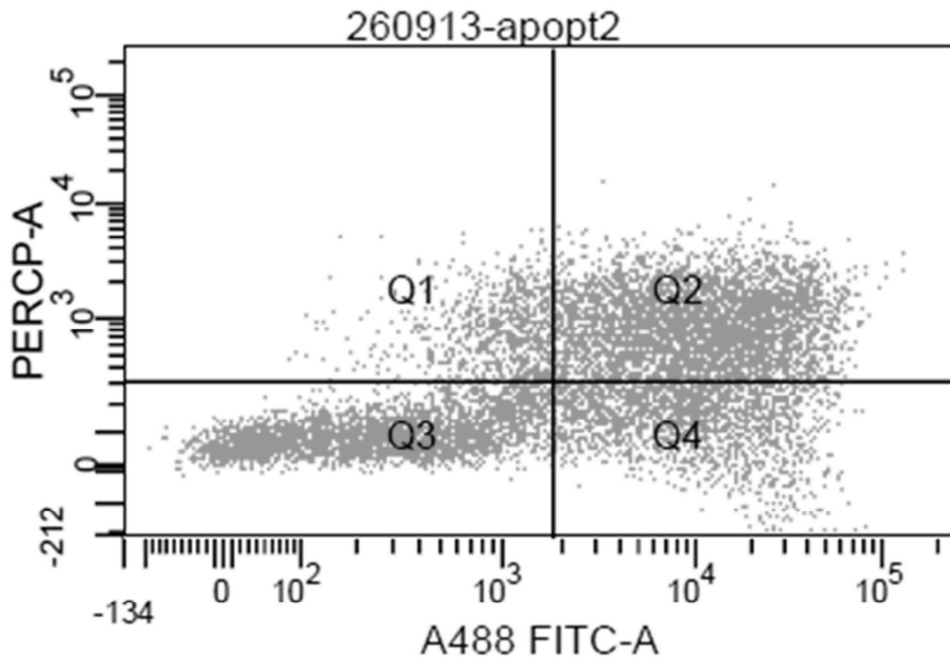
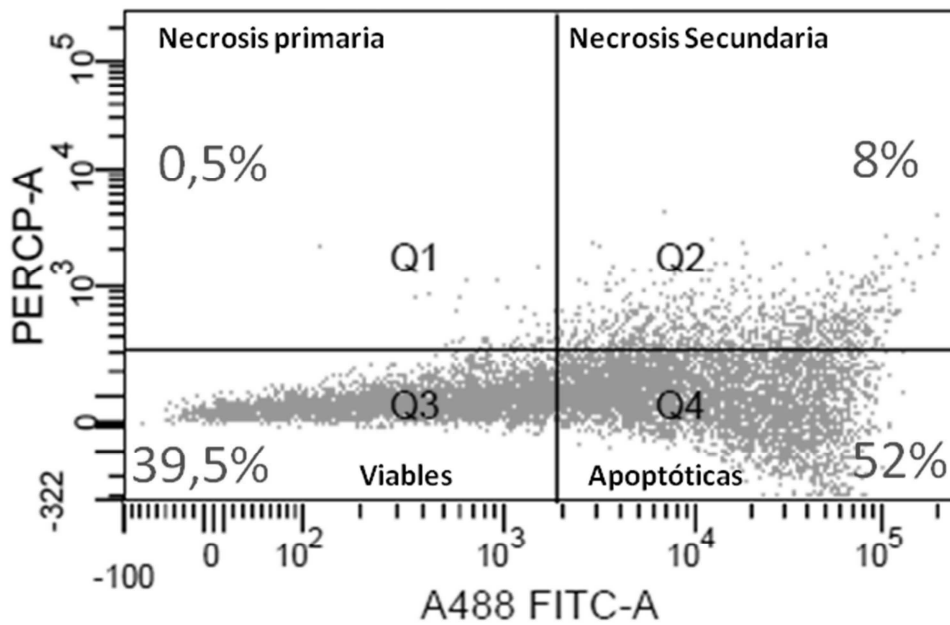


FIG. 3

a



b



c

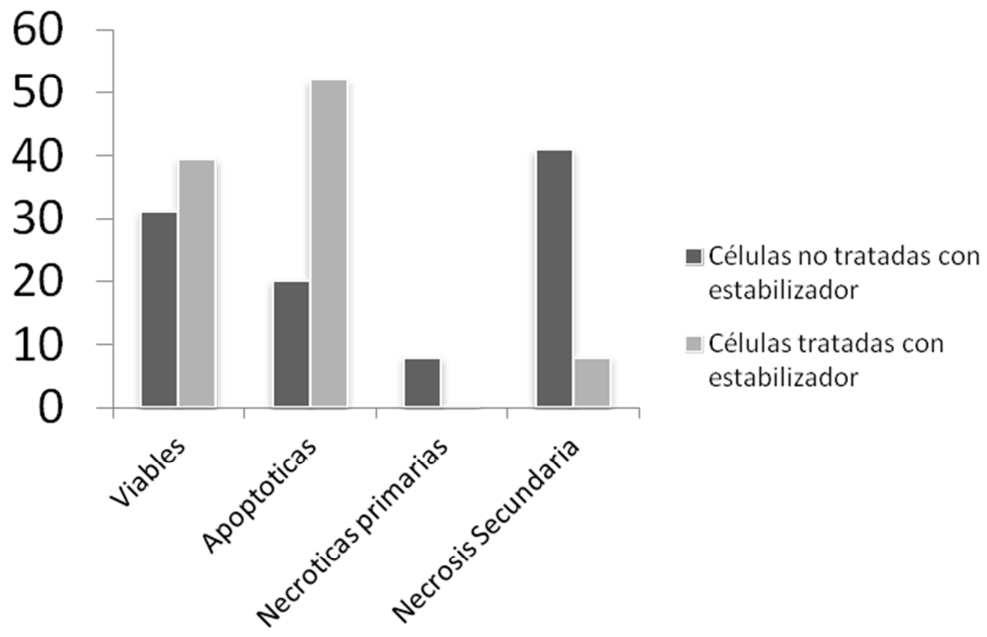
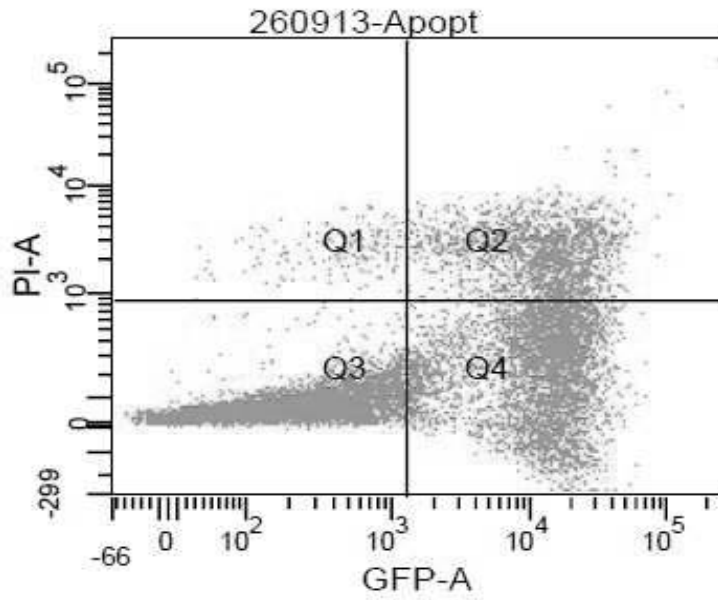
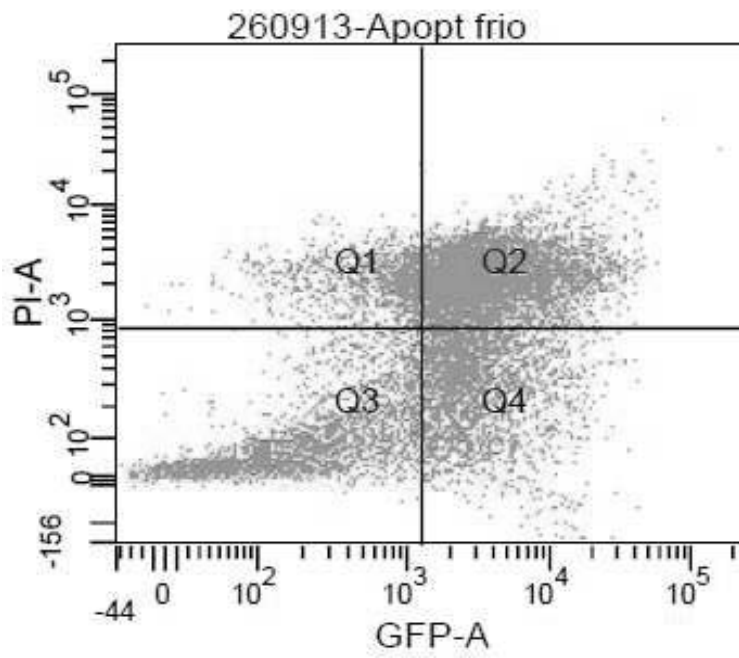


FIG. 4

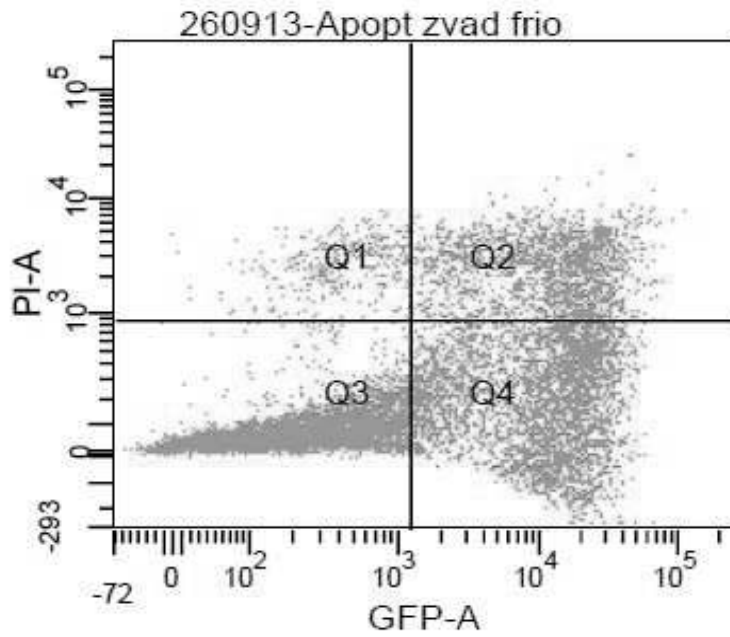
a



b



c



d

