

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 539**

51 Int. Cl.:

C12N 9/50 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07024577 .4**

96 Fecha de presentación: **25.02.1998**

97 Número de publicación de la solicitud: **1908823**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

54 Título: **Componente de la bromelaína**

30 Prioridad:
25.02.1997 GB 9703850
25.02.1997 GB 9703827
28.02.1997 GB 9704252
25.03.1997 GB 9706119

73 Titular/es:
SARANTIS PTY LTD
SUITE 339 433 LOGAN ROAD
STONES CORNER, QLD 4120, AU

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.03.2012

72 Inventor/es:
Mynott, Tracey Lehanne;
Engwerda, Christian y
Peek, Keith, Cortecs

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.03.2012

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 377 539 T3

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

DESCRIPCIÓN

Componente de la bromelaína

5 La presente invención se refiere a un componente de la bromelaína. En particular, la invención se refiere al uso de este componente de la bromelaína en medicina, en particular como un agente anticancerígeno y un agente inmunosupresor.

10 La bromelaína del tallo (bromelaína) es el nombre colectivo para las enzimas proteolíticas que se encuentran en los tejidos de la planta *Bromeliaceae*. Es una mezcla de diferentes restos derivados del tallo de la planta de la piña (*Ananas comosus*). Se sabe que la bromelaína contiene al menos cinco enzimas proteolíticas y también enzimas no proteolíticas, que incluyen una fosfatasa ácida y una peroxidasa; también puede contener actividad de amilasa y celulasa. Además se encuentran otros componentes diferentes.

15 La bromelaína se ha usado previamente en el tratamiento de una variedad de afecciones, incluyendo la inflamación, y en particular se ha usado en el tratamiento de la diarrea. El uso de la bromelaína en el tratamiento de la diarrea infecciosa se describe en el documento WO-A-9301800, donde se sugiere que la bromelaína trabaja destruyendo los receptores intestinales para patógenos por proteólisis, y en el documento WO-A-8801506, que enseña que la bromelaína separa los patógenos de los receptores intestinales.

20 Taussig y col., *Planta Medica*, 1985, 538-539 y Maurer y col., *Planta Medica*, 1988, 377-381 sugieren ambos que la bromelaína se puede usar en la inhibición del crecimiento tumoral. Los documentos US 5.223.406, DE-A4302060 y JP-A-59225122 también enseñan el uso de la bromelaína en el tratamiento del cáncer. El documento US 5.223.406 enseña que la bromelaína es capaz de inducir el factor de necrosis tumoral (TNF), mientras que el documento DE-A-4302060 enseña que la bromelaína puede prevenir la metástasis por la modificación estructural de la proteína de superficie tumoral CD44.

25 En el documento WO-A-9400147, se describen diferentes experimentos que demuestran que las enzimas proteolíticas y en particular la bromelaína, pueden inhibir la secreción. La solicitud también describe que la bromelaína puede reducir la actividad de unión de la toxina y puede inhibir el efecto de secreción de toxinas tales como la toxina lábil al calor (LT) y la toxina del cólera (CT) y también toxinas como la toxina estable al calor (ST). Esto es independiente del hecho de que la ST tiene un modo de acción muy diferente de la LT y CT. Estas observaciones se explicaban por el hecho de que un componente de la mezcla de bromelaína, la proteasa de la bromelaína del tallo, parece que puede modular las rutas de nucleótidos cíclicos y esto se discute con más detalle en el documento WO-A-9500169. Además, también se ha demostrado que la bromelaína inhibe la secreción producida por la ruta dependiente del calcio.

30 Los autores de la presente invención han estudiado la variedad de efectos biológicos de la bromelaína, y en particular, sus efectos en un modelo bien documentado de transducción intracelular de señales, en concreto la señalización por el receptor de linfocitos T (TCR)/CD3 y la producción de IL-2. El significativo avance en los últimos años ha conducido al entendimiento de los sucesos bioquímicos que se producen después del acoplamiento del TCR (revisado por Cantrell, *Annu. Rev. Immunol.* 14, 259-274, (1996)), y por consiguiente la señalización por el TCR proporciona un modelo excelente para la elucidación de los efectos de compuestos biológicamente activos. La activación eficaz de los linfocitos T requiere dos señales. La primera señal es generada por el complejo de TCR/CD3 después de acoplamiento con el péptido antígeno presentado por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) expresado en las células presentadoras de antígeno (APC) (Cantrell, 1996). La segunda, la señal coestimuladora, es generada por la unión de los receptores CD28 a los linfocitos T con la familia B7 de ligandos en las APC. Un elemento clave en la ruta de señalización implicado en la transducción de señales iniciadas por el receptor al núcleo, es la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK). Las mejores estudiadas de estas quinasas son las proteínas quinasas reguladas por señal extracelular (ERK)-1 y ERK-2 (también denominadas p44^{MAPK} y p42^{MAPK}, respectivamente). Las ERK son serina/treonina quinasas que son activadas cuando se fosforilan los restos de tirosina y treonina. In vitro, esta activación se invierte si cualquiera de los restos se desfosforila. Un miembro relativamente recién descubierto de la familia de MAPK son las quinasas NH₂-terminales de c-Jun (JNK) que existen como formas de 46 kDa y 55 kDa que también requieren la fosforilación para la activación. La activación de la ERK depende de p56^{Lck} y del acoplamiento del complejo TCR/CD3 a p21^{Ras}, con la posterior activación de la cascada de quinasas Raf-1/MEK1/ERK. La activación de JNK también requiere p21^{Ras}, así como señales generadas por el receptor coestimulador CD28 que activa proteínas que se unen a GTP (trifosfato de guanosina) (tales como Rac1 o Cdc42) que inducen la cascada de quinasas PAK/MEKK/SEK/JNK. La ERK activada fosforila Elk-1, que a su vez media la inducción de la actividad de c-fos después de la fosforilación de c-jun por JNK. c-fos y c-jun activados se combinan para formar la proteína AP-1 necesaria para la síntesis de la IL-2. Los sucesos anteriores se resumen en la figura 1. Todos los sucesos de señalización mencionados antes requieren la fosforilación de tirosina, puesto que los inhibidores de las proteínas tirosina quinasas (PTK) inhiben muchos sucesos asociados con la estimulación del TCR, incluyendo la activación de células T y la producción de IL-2.

60 En el documento WO-A-9600082, se mostraba que la bromelaína podía inhibir la fosforilación de tirosina y la activación de ERK-2 en células T estimuladas por el TCR, o con éster de forbol más ionóforo de calcio combinados. Ahora se ha encontrado que asociado con la disminución de la actividad de la ERK, la bromelaína disminuía la acumulación de ARNm de IL-2, IL-4 e IFN- γ en células T estimuladas con éster de forbol y ionóforo, pero no afectaba

a la acumulación de ARNm de citoquinas en las células estimuladas por el TCR. Estos datos sugieren la existencia de una ruta independiente de ERK y activada por TCR implicada en la producción de citoquinas en los linfocitos T.

5 A partir de la técnica anterior, está claro que la bromelaína es una mezcla que tiene una variedad de efectos fisiológicos diferentes. No se han caracterizado todos los componentes de la mezcla de bromelaína, y por lo tanto, excepto la proteasa de la bromelaína del tallo cuya actividad se ha descrito, no está claro cuál de los componentes es responsable de los diferentes efectos de la bromelaína. Esto es, por su puesto, una desventaja importante si la mezcla de bromelaína se va a administrar como producto farmacéutico porque mientras un componente de la bromelaína puede tener el efecto deseado, también puede haber efectos secundarios indeseados procedentes de la acción de algún otro componente de la mezcla de bromelaína.

15 Por lo tanto, sería beneficioso si se pudieran aislar los componentes individuales de la bromelaína que dan lugar a las actividades medicinales particulares y se pudieran administrar por separado de modo que se disminuya la posibilidad de efectos secundarios. Se ha identificado una fracción activa de la bromelaína bruta que es responsable de su capacidad para inhibir la activación de la ERK, y por lo tanto bloquear la ruta de la MAP quinasa. Aunque no es una proteína individual, esta fracción consiste sólo en algunos componentes y por lo tanto se reduce mucho la posibilidad de efectos secundarios cuando se administra a pacientes comparado con la bromelaína bruta.

20 La fracción designada CCS, se puede aislar de la mezcla de bromelaína por procedimientos convencionales, por ejemplo por cromatografía. La cromatografía de alto rendimiento (HPLC) es adecuada para este propósito y se puede lograr una separación particularmente buena de las proteínas de la bromelaína por cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC™) usando un material de empaquetamiento de la columna tal como S-sefarosa. Como se describirá con más detalle en los ejemplos, en la cromatografía en S-sefarosa usando un gradiente lineal de cloruro sódico de 0 a 0,8 M en tampón de acetato con 300 ml, la proteína era el último pico doble de la columna.

25 Un componente de la bromelaína que contiene proteínas que tienen pesos moleculares de aproximadamente 15,07 kDa, 25,85 kDa y 27,45 kDa determinados por SDS-PAGE, tiene puntos isoeléctricos de 10,4 y 10,45 y se puede obtener por el siguiente procedimiento:

30 i. se disuelve la bromelaína en tampón de acetato a pH 5,0;

ii. se separan los componentes de la bromelaína por cromatografía líquida de alto rendimiento de flujo rápido en S-Sefarosa eluyendo con un gradiente lineal de cloruro sódico de 0 a 0,8 M en tampón de acetato con 300 ml.

35 iii. se recoge la fracción correspondiente al pico doble final de la columna; y

iv. se aísla la proteína de la fracción recogida en (iii).

40 Se ha encontrado que la fracción, denominada CSS, tiene una serie de actividades potencialmente útiles. Primero, se ha encontrado que bloquea la fosforilación de ERK-2 y por lo tanto la cascada de la MAP quinasa. Además, bloqueaba la producción de IL-2 y la proliferación de linfocitos T CD4⁺. Sin embargo, la CCS no afecta a la proliferación de esplenocitos, lo cual sugiere que tiene un modo de acción selectivo. La CCS también bloqueaba de forma diferencial el crecimiento de líneas de células tumorales humanas que incluyen tumores de ovario, pulmón, colon, melanoma y pecho. La actividad diferente de la CCS contra las diferentes líneas celulares sugiere que la CCS tiene un modo de acción selectivo y que también puede actuar como agente anticancerígeno. El efecto inhibitorio de la CCS en ERK-2 depende de su actividad proteolítica, puesto que E-64, un inhibidor selectivo de la cisteína proteasa, podría anular el efecto de la CCS.

50 Aunque en el documento WO-A-9724138 se expone que las proteasas en general son capaces de disminuir la activación de la MAP quinasa, ahora se ha encontrado que este no es el caso, puesto que la tripsina no anula la señalización por los linfocitos T, y realmente en otros estudios se ha mostrado que aumenta la activación de la MAPK (Belham y col., 1996, *Biochem. J.*, 320, 939-946). Se ha mostrado que la trombina, una proteasa implicada en la cascada de coagulación de la sangre, también aumenta la activación de la quinasa MAP (Vouret-Craviari y col., 1993, *Biochem. J.*, 289, 209-214). Los autores de la invención ahora han mostrado que otras proteasas contenidas en la mezcla de bromelaína bruta no bloquean la activación de la ruta de la quinasa MAP.

60 Es posible que los efectos de la CCS en la ruta de la quinasa MAP en los linfocitos T sean mediados por los efectos proteolíticos específicos en la superficie celular. Se sabe que la bromelaína escinde la isoforma CD45 RA y separa selectivamente otras moléculas de su superficie de los PBMC humanos. La bromelaína también separa parcialmente los CD4 de las superficies de los linfocitos T. Puesto que CD45 y CD4 tienen una función estimuladora obligada en la activación de los linfocitos T mediada por TCR, la CCS puede interferir con la señalización por TCR afectando a estas moléculas. Aunque está bien reconocida la importancia de CD45 y CD4 para la transducción de señales iniciada por TCR, se pueden eludir los requisitos para la activación de células T mediante el uso de éster de forbol y ionóforo de calcio. El uso de ésteres de forbol y ionóforo combinados restaura la función normal de los linfocitos T que se habían hecho refractarios a la estimulación por TCR por el uso de inhibidores de la tirosina quinasa o que son deficientes en CD45 o p56^{Lck}.

Sin embargo, en el presente estudio, los autores de la invención han mostrado que no se restaura la función normal de los linfocitos T pretratados con la CCS cuando se tratan con PMA más ionóforo. Por lo tanto, se cree que el efecto inhibitorio de la CCS en ERK-2 no es mediado por los efectos en CD45 o CD4 en los linfocitos T. Posiblemente la CCS afecta una molécula de superficie todavía no identificada, que a su vez afecta a la ruta de la quinasa MAP. Por lo tanto, se cree que el efecto inhibitorio de la CCS en la producción de citoquinas no es mediado por sus efectos en CD45 y CD4 en los linfocitos T. El efecto inhibitorio de la CCS en la transducción de señales por los linfocitos T no era debido a la toxicidad del compuesto, puesto que la CCS no afectaba a la viabilidad de los esplenocitos o células GA15. La viabilidad de las células no era afectada de forma significativa por el cultivo en presencia de CCS durante periodos de tiempo mayores de 48 horas.

Puesto que se ha mostrado que la fracción de CCS de la bromelaína bruta bloquea la activación de la ruta de la quinasa MAP y bloquea la activación de los linfocitos T, la CCS puede ser útil en el tratamiento de enfermedades mediadas por linfocitos T.

Además de su importancia para la producción de IL-2 y activación de los linfocitos T, la ruta de la quinasa MAP también es importante para la producción de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de tipo insulina (IGF). Por lo tanto, la CCS bloqueará la producción de estos y otros factores de crecimiento y la producción de otras citoquinas tales como IL-4, IFN- γ , GM-CSF y muchos otros.

Además, como se ha mencionado antes brevemente, es posible que la CCS se pueda usar en el tratamiento del cáncer.

Por lo tanto, la CCS se puede usar en un procedimiento para el tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones mediadas por:

- i. activación de linfocitos T;
 - ii. activación de la ruta de la quinasa MAP; o
 - iii. la producción de factores de crecimiento o citoquinas;
- o en el tratamiento o prevención del cáncer.

Un componente de la bromelaína que contiene proteínas que tienen pesos moleculares de aproximadamente 15,07 kDa, 25,85 kDa y 27,45 kDa determinados por SDS-PAGE, tiene puntos isoeléctricos de 10,4 y 10,45 y se puede obtener por el siguiente procedimiento:

- i. se disuelve la bromelaína en tampón de acetato a pH 5,0;
- ii. se separan los componentes de la bromelaína por cromatografía líquida de alto rendimiento de flujo rápido en S-Sepharosa eluyendo con un gradiente lineal de cloruro sódico de 0 a 0,8 M en tampón de acetato con 300 ml.
- iii. se recoge la fracción correspondiente al pico doble final de la columna; y
- iv. se aísla la proteína de la fracción recogida en (iii).

se puede usar en medicina, en particular en el tratamiento o prevención de enfermedades y afecciones mediadas por:

- i. activación de linfocitos T;
 - ii. activación de la ruta de la quinasa MAP; o
 - iii. la producción de factores de crecimiento o citoquinas;
- o en el tratamiento o prevención del cáncer.

En otro análisis de la fracción de CCS de la bromelaína, los autores de la presente invención han encontrado que comprende más de un componente. La secuenciación de las proteínas en la fracción mostró que consiste en las cisteína proteasas ananaína y comosaína junto con otros componentes diferentes.

Por lo tanto, parece que tanto la ananaína como la comosaína o una mezcla de ambas pueden ser responsables de la actividad de la fracción de CCS de la bromelaína.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona ananaína o una mezcla de ananaína y comosaína para usar en el tratamiento de un cáncer mediante el bloqueo de las rutas de la quinasa MAP en una célula cancerígena.

En la solicitud anterior de los autores de la invención WO-A-9600082 se discute la inhibición de la cascada de la quinasa MAP por la bromelaína bruta. Sin embargo, en ese momento, no se pudo determinar que componente de la mezcla de bromelaína bruta era responsable de esta actividad, aunque se especuló que podía ser la proteasa de la bromelaína del tallo. Ahora se ha descubierto que además de bloquear las rutas de nucleótidos cíclicas, la proteasa de la bromelaína del tallo tiene alguna actividad contra la ruta de la quinasa MAP. Sin embargo, es mucho menos eficaz en el bloqueo de la cascada de la quinasa MAP que la fracción de CCS de la bromelaína de la presente invención. Realmente, ahora se ha encontrado que la fracción de CCS de la bromelaína está en la región de diez órdenes de magnitud más activa que la proteasa de la bromelaína del tallo en el bloqueo de la activación de la quinasa MAP.

La activación de la ruta de la quinasa MAP en los linfocitos para producir IL-2 y llevar a la expansión clonal de los linfocitos T es un componente esencial en la respuesta inmunitaria. La ausencia de este proceso puede tener consecuencias mortales, como puede observarse en gente con SIDA o mutaciones genéticas que dan como resultado defectos en los linfocitos T. Sin embargo, la activación de los linfocitos T también puede llevar a consecuencias perjudiciales. Por ejemplo, si se activan los linfocitos T autorreactivos, pueden resultar enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, es posible que la CCS se pueda usar en el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide, diabetes mellitus de tipo 1, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn y lupus.

Además, la activación de los linfocitos T específica para tejidos injertados puede conducir al rechazo del injerto o trasplante, y por lo tanto la CCS también se puede usar para prevenir esto.

La activación de los linfocitos T específicos de alérgeno también puede producir reacciones alérgicas. Se liberan de las células citoquinas inflamatorias y otros productos celulares, tales como la histamina, después de la exposición a alérgenos. La liberación de histamina y de citoquinas inflamatorias implica la ruta de la quinasa MAP y por lo tanto el bloqueo de la ruta de la quinasa MAP con la CCS es posible que sea eficaz en el tratamiento de alergias.

Además, es posible usar la CCS en la prevención del choque tóxico y otras enfermedades mediadas por la sobreproducción de endotoxinas bacterianas. El choque tóxico es mediado por la producción de lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias Gram negativas. Los LPS desencadenan la producción de TNF- α e interleuquina-1 por activación de la ruta de la quinasa MAP en macrófagos. La secreción de estas citoquinas provoca una cascada de producción de citoquinas de otras células del sistema inmunitario (incluyendo células T), lo cual conduce a leucocitosis, choque, coagulación intravascular y muerte.

Otro uso de la CCS es la prevención de la muerte celular programada (apoptosis). Este es un suceso especial por el que las células son estimuladas a destruir su propio ADN y morir. Es un suceso esencial en la mayoría de las respuestas inmunitarias (para prevenir la acumulación de masas de células), pero también puede tener consecuencias inmunosupresoras en algunos casos, tal como en la infección por el VIH y en el envejecimiento, de modo que mueren demasiadas células y no quedan suficientes para combatir la infección (Perandones y col., 1993, *J. Immunol.*, 151, 3521-3529). Debido a que el inicio de la apoptosis depende de sucesos de señalización celular específicos, que incluyen la activación de la ruta de la quinasa MAP, es posible que la CCS sea eficaz en el bloqueo de la apoptosis.

La activación continuada de linfocitos T durante la enfermedad crónica también puede conducir a consecuencias patológicas, como puede encontrarse en determinadas infecciones crónicas de parásitos, tales como enfermedades de granulomas crónicos tales como la lepra tuberculoide, esquistosomiasis y leishmaniasis visceral. Además, la invasión de parásitos y patógenos, y su posterior supervivencia en las células, dependen de que estos organismos usen las rutas de señalización celulares del huésped (Bliska y col., 1993, *Cell*, 73, 903-920). Por ejemplo, se ha demostrado que la *Salmonella* fosforila la quinasa MAP, lo cual permite que los macrófagos cojan las bacterias por endocitosis (Galan y col., 1992, *Nature*, 357, 588-589). Después las bacterias proliferan y destruyen la célula. Puesto que se ha mostrado que la CCS modifica las rutas de señalización del huésped, y en particular inhibe la quinasa MAP, otra de sus potenciales aplicaciones podría ser inhibir la invasión por parásitos y patógenos y su supervivencia en células.

La CCS también se puede usar para el tratamiento del cáncer, y realmente se ha mostrado que la CCS puede bloquear el crecimiento de tumores humanos *in vitro*. El mecanismo antitumoral de la acción de la CCS sigue sin estar determinado, pero parece probable que sea un resultado del bloqueo de la activación de la ruta de ERK-2.

Como se ha mencionado antes, la activación de la MAP quinasa depende de p21^{Ras} y Raf-1, que son oncogenes importantes. Las proteínas de p21^{Ras} y Raf-1 ayudan a transmitir señales de los receptores de factores de crecimiento en la superficie de las células a las quinasas MAP para estimular la proliferación o diferenciación celulares. Los genes oncogénicos (o mutantes) p21^{Ras} y Raf-1 producen proteínas defectuosas que han adquirido independencia de los factores de crecimiento suministrados externamente y, al mismo tiempo ya no pueden responder a señales externas inhibitorias del crecimiento. Por lo tanto, las proteínas mutantes de p21^{Ras} y Raf-1 son persistentemente hiperactivas y su actividad catalítica desenfrenada tiene un efecto perjudicial en el control del crecimiento celular. Por lo tanto, los genes oncogénicos p21^{Ras} y Raf-1 promueven el cáncer y la formación de tumor mediante la alteración de los controles normales de la proliferación y diferenciación celulares. Aproximadamente 30 % de los cánceres humanos tienen mutaciones en un gen p21^{Ras}.

Dado que las señales transmitidas por p21^{Ras} y Raf-1 se pueden bloquear a través de la quinasa MAP, se espera que la CCS bloquee el crecimiento del cáncer y tumores. La fracción de proteínas de la presente invención será útil, por lo tanto, para el tratamiento de muchos tipos diferentes de cáncer incluyendo cánceres sólidos tales como cáncer de ovario, colon, pecho o pulmón y melanoma, así como tumores no sólidos y leucemia.

5 Normalmente la fracción de bromelaína se formulará antes de la administración a pacientes, y por lo tanto una composición farmacéutica o veterinaria puede comprender la fracción CCS de la bromelaína, junto con un excipiente aceptable en farmacia o veterinaria.

10 La fracción CCS se puede administrar por una variedad de rutas que incluyen la administración entérica, por ejemplo oral, nasal, bucal, tópica o anal, o administración parenteral, por ejemplo por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal.

15 En muchos casos, puede preferirse la vía oral ya que a menudo esta es la vía que los pacientes encuentran la más aceptable. La vía oral puede ser particularmente útil si se requieren muchas dosis de la proteína.

20 Cuando se elige la administración oral, puede ser conveniente formular la fracción CCS en una preparación con recubrimiento entérico con el fin de ayudar a su supervivencia a través del estómago. Alternativamente, se puede usar otra forma de dosificación de administración oral, por ejemplo un jarabe, elixir o una cápsula de gelatina dura o blanda, cualquiera de las cuales puede tener recubrimiento entérico.

25 Sin embargo, en determinadas circunstancias puede ser más conveniente usar una vía parenteral. Para la administración parenteral, la proteína se puede formular en agua destilada u otro disolvente o agente de suspensión farmacéuticamente aceptable.

30 La dosis adecuada de la fracción CCS para administrar a un paciente la puede determinar el médico. Sin embargo, como guía, una dosis adecuada puede ser de aproximadamente 0,5 a 20 mg por kg de peso corporal. Se espera que en la mayoría de los casos, la dosis sea de aproximadamente 1 a 15 mg por kg de peso corporal y preferiblemente de 1 a 10 mg por kg de peso corporal. Por lo tanto, para un hombre que pesa aproximadamente 70 kg, una dosis típica sería de aproximadamente 70 a 700 mg.

Ahora la invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos y a los dibujos en los que:

35 La fig. 1 es una representación en diagrama de los sucesos de transducción de señales asociados con la activación de linfocitos T que conduce a la producción de IL-2.

La fig. 2 es un perfil de elución ultravioleta de la bromelaína bruta después de la cromatografía de intercambio de cationes en medio de alto rendimiento de sefarosa SP.

40 La fig. 3 es una gráfica que muestra la actividad proteolítica y el contenido de proteína de las fracciones de bromelaína brutas, después de la cromatografía de intercambio catiónico en medio de alto rendimiento de sefarosa SP;

45 La fig. 4 es un SDS-PAGE de las fracciones combinadas de la cromatografía de alto rendimiento en sefarosa SP llevada a cabo en geles de gradiente de T 4-20 %, en la que las hileras 1 a 4 y 6 a 9 contienen las proteínas CCT, CCV, CCX y CCZ y CCY, CCW, CCU y CCS respectivamente y las hileras 5 y 10 contienen los marcadores de peso molecular.

50 La fig. 5 muestra el enfoque isoeléctrico de las fracciones combinadas llevado a cabo en geles de gradiente de pH 3-11, en el que las hileras 1, 11 y 12 muestran los marcadores de IEF alto, y las hileras 2 y 13 muestran la bromelaína bruta y las hileras 3 a 10 muestran las proteínas CCT, CCV, CCX, CCZ, CCY, CCW, CCU y CCS, respectivamente.

55 La fig. 6 es una transferencia Western que usa mAb antifosfotirosina que demuestra que la CCS reduce la fosforilación de tirosina de la proteína p42 kDa (ERK-2). Se trataron células Th0 con fracciones de bromelaína (50 µg/ml) durante 30 min, se lavaron y después se estimularon con PMA (20 ng/ml) y ionóforo (1 µM) combinados durante 5 min. Las células no estimuladas sirvieron como controles. Las células después se lisaron y los líquidos sobrenadantes post nucleares se sometieron a SDS-PAGE y transferencia Western. En esta figura los símbolos negros indican proteínas fosforiladas por PMA más ionóforo combinados. Los símbolos en blanco indican proteína ERK-2 reducida por el tratamiento con CCS.

60 La fig. 7 es una transferencia Western que usa mAb anti-fosfotirosina que demuestra que la CCS aumenta la fosforilación de tirosina de los sustratos proteicos. Se trataron células Th0 con CCS, bromelaína bruta (Brom.), proteasa de bromelaína del tallo (SBP) o fracción de CCT (50 µg/ml) durante 30 min, se lavaron y después se estimularon con PMA (20 ng/ml) y ionóforo (1 µM) combinados durante 5 min. Las células no estimuladas sirvieron como controles (Cont.). Después las células se lisaron y los líquidos sobrenadantes postnucleares se sometieron a SDS-PAGE y transferencia Western. En esta figura los símbolos negros indican proteínas fosforiladas por CCS pero no por otros tratamientos. Los símbolos en blanco indican proteína fosfoproteínas reducidas por CCS y tratamiento

con bromelaína bruta.

La fig. 8 es una transferencia Western que usa mAb anti-fosfotirosina que muestra que el efecto inhibitor de la CCS en ERK-2 depende de su actividad proteolítica y ocurre de una forma dependiente de la dosis. Se trataron células Th0 con CCS (0 a 25 $\mu\text{g/ml}$) o CCS incubada con el inhibidor de proteasa seleccionado, E-64, durante 30 min. Después, las células se lavaron y después se estimularon con PMA (20 ng/ml) y ionóforo (1 μM) combinados durante 5 min. Después las células se lisaron y los líquidos sobrenadantes postnucleares se sometieron a SDS-PAGE y transferencia Western. En esta figura los símbolos negros indican proteínas fosforiladas por CCS. Los símbolos en blanco indican fosfoproteína ERK-2 inhibida por CCS activa pero no por CCS inactivada.

La fig. 9 es una inmunotransferencia que confirma que la fosfoproteína de 42 kDa inhibida por la CCS es ERK-2. Se trataron células Th0 con CCS (50 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 min, o no se trataron, se lavaron y después se estimularon con PMA (20 ng/ml) y ionóforo (1 μM) combinados durante 5 min. Los lisatos celulares se inmunotransfirieron con mAb anti-ERK-2.

La fig. 10 es una transferencia Western que usa mAb anti-fosfotirosina que muestra que el mAb anti-CD3 ϵ cruzado induce la fosforilación de tirosina de múltiples proteínas. Las células Th0 se estimularon con anticuerpo anti-CD3 ϵ cruzado durante 0 a 20 min. Después las células se lisaron y los líquidos sobrenadantes postnucleares se sometieron a SDS-PAGE y transferencia Western. Los símbolos negros indican proteínas con tirosina fosforilada inducida por mAb anti-CD3 ϵ .

La fig. 11 es una transferencia Western que usa mAb anti-fosfotirosina que demuestra que la CCS inhibe la fosforilación de tirosina en linfocitos T estimulados por TCR. Se trataron células Th0 con CCS (0 a 5 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 min, se lavaron y después se trataron con mAb anti-CD3 ϵ cruzado durante 5 min. Después las células se lisaron y los líquidos sobrenadantes postnucleares se sometieron a SDS-PAGE y transferencia Western. En esta figura, los símbolos indican la fosforilación de tirosina de ERK-2 inducida por mAb anti-CD3 ϵ , que es reducida por la CCS.

La fig. 12 es una transferencia Western que usa mAb anti-Raf-1 que muestra que la CCS inhibe el cambio de movilidad de Raf-1. Se trataron células Th0 con CCS (0 a 50 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 min, se lavaron y después se estimularon con (A) PMA más ionóforo combinados o (B) después mAb anti-CD3 ϵ cruzado durante 5 min. Después las células se lisaron y los líquidos sobrenadantes postnucleares se sometieron a SDS-PAGE y transferencia Western.

La fig. 13 son un par de gráficas que muestran que la CCS disminuye la producción de IL-2 y la proliferación en linfocitos T CD4 $^{+}$ purificados. Los linfocitos T se trataron con CCS (50 $\mu\text{g/ml}$), se lavaron y después se cultivaron en medio solo o con mAb anti-CD3 ϵ inmovilizado y mAb anti-CD28 soluble. (A) La producción de IL-2 se determinó por ensayo de CTL-L como se describe en el ejemplo 5. (B) La proliferación se determinó por la incorporación ^3H -timidina. Los linfocitos T CD4 $^{+}$ cultivados en ausencia de mAb (estímulo) no produjeron IL-2 detectable y no proliferaron.

La fig. 14 son un par de gráficas que muestran que la CCS disminuye la producción de IL-2 por los esplenocitos pero no inhibe la proliferación de esplenocitos. Los esplenocitos se trataron con CCS (50 $\mu\text{g/ml}$), se lavaron y después se cultivaron en medio solo o con mAb anti-CD3 ϵ inmovilizado. (A) La producción de IL-2 se determinó por el ensayo de CTL-L como se describe en el ejemplo 5. (B) La proliferación se determinó por la incorporación de ^3H -timidina. Los esplenocitos cultivados en ausencia de mAb (estímulo) no produjeron IL-2 detectable y no proliferaron.

La fig. 15 es una gráfica que muestra que la CCS inhibe el crecimiento de células tumorales in vitro. Se trataron líneas de células de cáncer con CCS (50, 10, 2,5, 1 y 0,25 $\mu\text{g/ml}$) o agua como control. Después de 96 h de tratamiento, se evaluó el efecto de la CCS en el crecimiento de las células tumorales. Las columnas representan las concentraciones inhibitoras de 50 % (CI_{50} $\mu\text{g/ml}$) de CCS (la cantidad de CCS necesaria para inhibir 50 % del crecimiento de las células tumorales).

EJEMPLO 1 - Purificación de proteínas de bromelaína

a. Materiales

Reactivos La bromelaína (E.C 3. 4.22.4; actividad proteolítica, 1, 541 nmol/min/mg) se obtuvo de Solvay Inc. (Alemania). La sifonosa S de flujo rápido, Pharmalyte 3-10 $^{\text{TM}}$, Ampholine 9-11 $^{\text{TM}}$, Ready Mix IEF $^{\text{TM}}$ (acrilamida, bisacrilamida) y marcadores IEF $^{\text{TM}}$ se obtuvieron de Pharmacia Biotech. Los geles de acrilamida premoldeados al 4-20 % y los marcadores de peso molecular de amplio intervalo se obtuvieron en Bio-Rad Laboratories. Todos los demás reactivos eran de calidad analítica y se obtuvieron de Sigma Chemical Co. o de British Drug House.

b. Ensayo de proteinasa

La actividad proteolítica de la bromelaína se determinó usando un ensayo basado en placa de microvaloración

interna usando el sustrato sintético Z-Arg-Arg-pNA. Este ensayo se basó en el descrito por Filippova y col. en *Anal. Biochem.*, **143**, 293-297 (1984). El sustrato era Z-Arg-Arg-pNA como describen Napper y col. en *Biochem. J.*, **301**, 727-735, (1994).

5 **c. Ensayo de proteínas**

La proteína se midió usando un kit suministrado por Bio-Rad que es un procedimiento modificado del de Lowry y col. (*J. Biol. Chem.* (1951) **193**, 265-275). Las muestras se compararon con patrones de albúmina de suero bovino (0 a 1,5 mg/ml) preparados en solución salina al 0,9 % o en tampón de acetato 20 mM pH 5,0, según sea adecuado.

10

d. Preparación de bromelaína

Todos los pasos siguientes se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20 a 25 °C). Se preparó una solución de bromelaína (30 mg/ml) disolviendo 450 mg de polvo en 15 ml de tampón de acetato 20 mM (pH 5,0) que contenía EDTA de sodio 0,1 mM. La solución se dispensó en tubos de microcentrifuga 10 x 1,5 ml, y se centrifugaron a 13.000 x g durante 10 minutos para separar el material insoluble. Los líquidos sobrenadantes transparentes se combinaron y se usaron para la cromatografía.

15

20 **e. Cromatografía de alto rendimiento de flujo rápido en S-sefarosa**

Se preparó una columna de flujo rápido de S-sefarosa empaquetando 25 ml de medio en una columna XK 16/20™ (Pharmacia Biotech) y se equilibró con tampón de acetato 20 mM (pH 5,0) que contenía EDTA 0,1 mM en un sistema FPLC™ a 3 ml/min. Se inyectaron 5 ml de solución de bromelaína en la columna. Se recogió la proteína no unida y la columna se lavó con 100 ml de tampón de acetato. La proteína unida a la columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0,8 M en tampón de acetato, con 300 ml. Se recogieron fracciones de 5 ml a lo largo del gradiente y la figura 2 muestra un cromatograma de UV típico de la bromelaína bruta obtenida de este procedimiento.

20

25

Después, se analizaron en las fracciones la proteína y la actividad proteolítica como se ha descrito antes y la figura 3 muestra la actividad proteolítica contra el péptido sintético Z-Arg-Arg-pNA y el contenido de proteína de las fracciones individuales. El perfil de contenido de proteína refleja el del UV, como era de esperar, pero la actividad proteolítica principal está confinada a los dos picos principales que corresponden a los de la proteasa de la bromelaína (SBP). Se observan actividades pequeñas en otras zonas del cromatograma que pueden corresponder a otras proteasas distintas de la SBP, tal como la última fracción de CCS que eluye, que contiene a nanaína y comosaína.

30

35

Se combinaron los picos principales identificados del perfil UV de tres experimentos sucesivos y se nombraron como se indica en la Tabla 1. Las fracciones combinadas se usaron para la caracterización fisicoquímica. Las fracciones combinadas se concentraron por ultrafiltración y se intercambiaron con tampón usando columnas PD10 en solución salina isotónica (NaCl al 0,9 % en peso/vol). El contenido de proteína y la actividad de Z-Arg-Arg-pNA se calcularon antes de los ensayos biológicos y se muestran en la Tabla 2.

40

Las fracciones combinadas se procesaron para el análisis como se describe a continuación.

45 **Tabla 1. Resumen de las fracciones combinadas de la bromelaína fraccionada por HP en sefarosa SP (QC2322)**

Componente	Descripción	Fracciones combinadas (inclusive)
CCT	Fluye a través (componentes no unidos)	No unido fluye a través de la columna
CCV	Primer pico que sale de la columna	8-9
CCX	Segundo pico agudo que sale de la columna	13-14
CCZ	Pico pequeño en el borde ascendente del tercer pico principal de la bromelaína	19-20
CCY	Primer pico principal de la bromelaína	23-24
CCW	Segundo pico principal de la bromelaína	27-29
CCU	Pico pequeño en el borde descendente del segundo pico principal de la bromelaína	33-34
CCS	Último pico doble que sale de la columna	39-44

Tabla 2. Contenido de proteína calculado y actividad de Z-Arg-Arg-pNA de las fracciones combinadas usadas para ensayar la actividad biológica

Fracciones combinadas	Actividad de Z-Arg-Arg-pNa (μ Moles/min/ml)	Contenido de proteína (mg/m)
CCT	11,30	1,00
CCV	9,78	1,00
CCX	71,71	1,00
CCZ	688,81	1,00
CCY	1500,0	0,574
CCW	1500,0	0,543
CCU	1500,0	0,421
CCS	379,76	1,00

5 f. Procesamiento de las fracciones combinadas

Se determinaron la actividad proteolítica y el contenido de proteína de las fracciones combinadas y las concentraciones se ajustaron a aproximadamente 1,4 mg/ml de proteína o 105 μ moles/min/ml de actividad de proteinasa usando una celda agitada Filtron™ que contenía una membrana de ultrafiltración con corte de exclusión de peso molecular nominal de 10 kDa. Después las fracciones se intercambiaron con tampón usando columnas PD10™ (Pharmacia Biotech) en solución salina isotónica (NaCl al 0,9 % en peso/vol), se esterilizaron por filtración (0,2 μ m) y se ajustaron para el contenido de proteína o la actividad proteolítica. Después las muestras se congelaron a -80 °C y se usaron en los estudios in vitro descritos a continuación.

15 g. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

Las muestras combinadas de FPLC™ se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en gel es de gradiente de T 4 a 20 % premoldeado. Las muestras se prepararon para la electroforesis por precipitación con ácido, en la que se mezclaron 100 μ l con un volumen igual de ácido tricloroacético (TCA) al 20 % en peso/vol. La proteína precipitada se recogió por centrifugación a 13.000 x g durante 10 min y se descartó el líquido sobrenadante. El sedimento se lavó dos veces con 0,5 ml de éter dietílico y se dejó secar al aire a temperatura ambiente. Después los sedimentos se disolvieron en 300 μ l de tampón de muestra de SDS-PAGE (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 que contenía glicerol al 10 % en vol/vol, dodecilsulfato de sodio al 2 % en p/vol y ditiotreitol 40 mM) y se calentó a 95 °C en un baño de agua.

Los patrones de peso molecular de amplio intervalo de SDS-PAGE diluidos 1:20 en tampón de muestra de SDS-PAGE se trataron de forma similar y se hicieron correr con las muestras. Los geles se hicieron correr en un sistema de electroforesis mini Protean II™ de acuerdo con el protocolo de Bio-Rad a 240 V y hasta que el frente de colorante alcanzaba el extremo del gel (30 a 45 min).

Después de la electroforesis, las proteínas separadas se tificaron toda la noche con mezcla orbital en una solución de azul brillante coloidal G-250 al 0,075 % en peso/vol que contenía ácido fosfórico al 1,5 % en vol/vol, sulfato amónico al 11,25 % en p/vol y metanol al 25 % en vol/vol. Los geles se destiñeron para obtener un fondo transparente, en una solución de metanol al 25 % en vol/vol y ácido acético al 10 % en vol/vol.

RESULTADOS

La pureza de las fracciones se muestra por SDS-PAGE en la figura 4. Todas las fracciones combinadas excepto la que fluye a través de la columna (CCT) mostraron que la proteína principal presente tenía un peso molecular aproximadamente entre 25-28 kDa. Esto corresponde al peso molecular de las cisteína proteinasas aisladas de la bromelaina por otros autores (Rowan y col., *Methods in Enzymology*, (1994), 244, 555-568). La pureza de las fracciones CCX, CCZ, CCY y CCW parece que es alta. Se pueden observar componentes minoritarios de peso molecular menor en algunas fracciones, en particular en las CCT, CCV, CCX y CCS. Las fracciones combinadas CCU y CCS contienen un doblete entre 25-28 kDa; las cargas de gel más altas de las fracciones CCX, CCZ, CCY y CCW significan que también pueden encontrarse bandas dobles en estas fracciones. En la tabla 3 se muestra un resumen de los componentes y sus pesos moleculares calculados en las fracciones combinadas, determinados por SDS-PAGE.

Las proteínas en las fracciones combinadas CCX, CCZ, CCY+CCW y CCU se transfirieron sobre nitrocelulosa después de SDS-PAGE por transferencia Western y se trataron con sondas de antisuero de conejo contra proteasa de bromelaina del tallo (SBP) purificada (no se muestran los resultados). Todas las bandas de proteínas en estas fracciones combinadas fueron reconocidas por anticuerpos en los sueros, lo que indicaba proteínas inmunológicamente similares, probablemente pertenecientes a la familia de enzimas de las cisteína proteinasas.

Tabla 3. Resumen de los pesos moleculares de proteínas encontradas en fracciones combinadas de HP en sefarosa SP, determinados por SDS-PAGE.

Fracciones combinadas	Peso molecular (kDa) de las bandas de proteínas principales	Peso molecular (kDa) de las bandas de proteínas secundarias
CCT	76,03	15,07
CCV	15,07, 25,85, 28,28, 76,03	
CCX	25,08	15,07, 76,03
CCZ	27,45	13,37, 16,49, 76,03
CCY	27,45	6,5
CCW	27,45	
CCU	27,45, 28,28	
CCS	15,07, 25,85, 27,45	

5 h. Enfoque isoeléctrico

Las fracciones combinadas (0,5 a 1,0 mg/ml) se diluyeron 1:3 con agua desionizada y se hicieron correr en geles de gradiente de pH 3 a 11. Los geles se moldearon usando Ready Mix IEFTM para producir un gel de poliacrilamida de T 5,5 % y C 3 %, que contenía glicerol al 10 % en vol/vol, Pharmalyte 3-10TM al 5,0 % y Ampholine 9-11TM al 2,5 %.

10 Brevemente, se cargaron 10 µl de muestra y marcadores de pl alto en los geles después del preenfoco a 700 V. La entrada de muestra era a 500 V durante 10 min, el enfoque era a 2500 V durante 1,5 horas y el estrechamiento de banda a 3000 V durante 10 min. Después de la electroforesis las proteínas se fijaron con una solución de TCA al 20 % en p/vol durante 30 min, se lavaron para la decoloración durante 30 min para eliminar el TCA y se tiñeron con azul brillante G-250 como se ha descrito para la SDS-PAGE (véase antes).

15 RESULTADOS

La figura 5 muestra que todas las fracciones excepto la CCX contenían proteínas básicas con enfoque más allá del marcador de pl 9,3. Las interacciones de carga localizadas con los grupos funcionales del medio cromatográfico pueden explicar porque las proteínas de pl 3,8 y 3,85 en CCX, se adsorbían en una resina de intercambio catiónico a pH 5,0. La CCZ estaba presente como una sola banda de pl 9,7, mientras que las fracciones combinadas CCY, CCW y CCU contenían múltiples bandas de puntos isoeléctricos en el intervalo de pH 9,5-9,8. Al menos parte de esta heterogeneidad se puede explicar por la variación de los restos de carbohidratos de una cadena principal común de la proteína de la bromelaína del tallo. Los valores están de acuerdo con los descritos en la bibliografía de pl 9,45-9,55 para la bromelaína (Rowan y col., *Methods in Enzymology*, (1994), **244**, 555-568). Las fracciones combinadas de CCS contenían dos proteínas básicas de pl mayor que 10,25. Calculados por extrapolación dan pl de 10,4 y 10,45. Estas corresponden a la ananaína y comosaína y están de acuerdo con otros cálculos (Rowan y col., véase antes) de pl mayores que 10. Los pl de las proteínas en cada una de las fracciones combinadas se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Resumen de los puntos isoeléctricos calculados de las proteínas encontradas en las fracciones combinadas de HP en sefarosa SP.

Fracciones combinadas	Puntos isoeléctricos de las proteínas
CCT	No detectado
CCV	No detectado
CCX	3,8, 3,85
CCZ	9,7
CCY	9,6, 9,7
CCW	9,57, 9,6, 9,7
CCU	9,57, 9,6, 9,75
CCS	10,4, 10,45

35 EJEMPLO 2 - Análisis de aminoácidos NH₂-terminales de los componentes de la bromelaína

En un experimento separado, se hicieron correr las fracciones combinadas de la bromelaína por SDS-PAGE y se transfirieron como antes sobre una membrana de PVDF. La membrana se tiñó con azul coomassie R-250 al 0,025 % en p/vol, se disolvieron en metanol al 40 % en vol/vol durante 10 min, seguido de destañido en metanol al 50 % en vol/vol. La membrana se secó al aire a temperatura ambiente y se llevó a cabo la secuenciación de los aminoácidos NH₂-terminales de las proteínas teñidas. Brevemente, se cortó la banda de proteína de la membrana y se puso en el cartucho superior del secuenciador. El análisis de los aminoácidos NH₂-terminales de los componentes de la bromelaína se determinó por degradación de Edman usando un secuenciador de fase gaseosa (Applied Biosystems) equipado con un analizador de feniltiohidantoína-aminoácido en línea. La Tabla 5 muestra los primeros 21 aminoácidos NH₂-terminales de CCZ, CCX, proteasa de bromelaína del tallo, ananaína y comosaína.

Tabla 5. Similitudes de las secuencias NH₂-terminales de la proteína CCZ y las de las proteinasas conocidas aisladas de la bromelaína

Proteinasa	Posición desde el extremo N
CCZ	V L P D S I D W R Q K G A V T E V K N R G 1 5 10 15 20
CCX	V P Q S I D W R D Y G A V N E V K N 4 9 14
Proteasa de bromelaína del tallo	A V P Q S I D W R D Y G A V T S V K N Q N 1 5 10 15 20
Ananaína	V P Q S I D W R D S G A V T S V K N Q G 1 4 9 14 19
Comosaína	V P Q S I D W R N Y G A V T S V K N Q G 1 4 9 14 19

5 Todas las proteínas comparten homología de secuencia. La ananaína y comosaína difieren en 2 de 20 aminoácidos cuando se comparan con la proteasa de la bromelaína del tallo. CCZ difiere en 8 de 21 aminoácidos cuando se comparan con la proteasa de la bromelaína del tallo. CCZ difiere de la ananaína y comosaína en 6 de los 20 aminoácidos. La comosaína difiere en 2 aminoácidos de la ananaína. Aunque está claro que estas proteínas están estructuralmente relacionadas, son todas distintas y muestran divergencia entre ellas. Estas proteinasas también difieren en su especificidad por el sustrato de proteinasa y su actividad biológica.

EJEMPLO 3 - La fracción de CCS inhibe la fosforilación de tirosina de la fosfoproteína p42 kda

15 **a. Materiales**

Anticuerpos. Los mAb anti-CD3 cadena ϵ (145-2C11) y los mAb anti-CD28 (PV-1) se adquirieron en Pharmingen (San Diego, CA) y el Ab de cabra anti-IgG de hámster en Sigma (Dorset, Reino Unido). Los mAb de ratón anti-fosfotirosina (4G10), mAb de ratón anti-MAPK R2 (ERK-2) y mAb de ratón anti-Raf-1 eran de UBI (Lake Placid, NY). Los Ab de cabra anti-IgG de conejo y de cabra anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) eran de BioRad (Hemel Hemstead, Hertfordshire, Reino Unido). La IgG MAPk fosfoespecífica policlonal de conejo que reconoce las MAPk p44 y p42 con tirosina fosforilada eran de New England Biolabs (Hitchin, Hertfordshire, Reino Unido).

25 Reactivos. El 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) y el ionóforo de calcio A23187 se adquirieron en Sigma. La bromelaína (E.C 3.4.22.4; actividad proteolítica, 1,541 nmol/min/mg) se obtuvo en Solvay Inc. (Alemania). E-64 (L-trans-epoxisuccinil-leucilamido-(4-guanidino)butano, un inhibidor de cisteína proteasa selectivo era de Sigma.

30 Células. El hibridoma de linfocitos T GA15 fue un regalo generoso de B. Fox (ImmuLogic Pharmaceutical Corporation, Boston, MA). GA15 se generó por fusión del timoma BW5147 con el clon T_H2 F4 específico para KLH asociado con I-A^b, y se mantuvieron como se ha descrito previamente (Fox, 1993, *Int. Immunol.*, 5, 323-330). GA15 presenta un fenotipo de célula T_H0 puesto que producen IL-2, IL-4 e IFN- γ después de estimulación con el mAb anti-CD3 ϵ cruzado (Fox, 1993)

35 **b. Estimulación de linfocitos T.** Las células (2×10^7) suspendidas en RPMI 1640 se trataron con CCS (1 a 50 μ g/ml) diluida en solución salina (al 0,9 % (p/vol)) durante 30 min a 37 °C. Las células tratadas como control se trataron con un volumen igual de solución salina (diluyente). Con concentraciones altas de CCS (50 ó 100 μ g/ml) se produjo agregación de células, como se había observado previamente en estudios con bromelaína bruta. Después del tratamiento, los agregados de células se dispersaron ligeramente lavando las células 3 veces y después volviéndolas a suspender en RPMI de nueva aportación. Las células fueron estimuladas por la superficie celular con mAb cruzado contra el TCR (anti-CD3 ϵ), o directamente usando PMA (20 ng/ml) y ionóforo (1 μ M) combinados durante los tiempos indicados en las leyendas de las figuras y el texto.

45 La estimulación por el TCR se llevó a cabo incubando primero linfocitos T en hielo durante 30 min con mAb anti-CD3 ϵ (20 μ g/ml). Después se separó el exceso de mAb lavando una vez a 4 °C y el mAb anti-CD3 ϵ se cruzó con anticuerpo de cabra anti-IgG de hámster (20 μ g/ml) a 37 °C. La estimulación se terminó por la adición de tampón de lisis enfriado con hielo (Tris 25 mM, pH 7,4, NaCl 75 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 al 0,5 %, ortovanadato de sodio

2 mM, fluoruro de sodio 10 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, leupeptina 74 $\mu\text{g/ml}$, PMSF 740 μM y aprotinina 74 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 min con rotación continua a 4 °C. Los lisatos se clarificaron (14.000 x g durante 10 min) y se añadió un volumen igual de tampón de muestra de SDS-PAGE 2X (Tris 50 mM, pH 7, 2-ME 700 mM, glicerol al 50 % (vol/vol), SDS al 2 % (p/vol), azul de bromofenol al 0,01 % (p/vol)) a los líquidos sobrenadantes postnucleares. Las proteínas se solubilizaron a 100 °C durante 5 min y se resolvieron por SDS-PAGE las muestras que contenían 1×10^6 equivalentes de células.

c. Inmunotransferencia. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) que después se bloquearon con albúmina de suero bovino al 5 % (p/vol) (Sigma, fracción V; BSA), Nonidet P-40™ al 0,1 % en solución salina tamponada con Tris (NaCl 170 mM y Tris 50 mM, pH 7,4; TBS). Las inmunotransferencias se incubaron con los anticuerpos adecuados como se indica en las leyendas de las figuras. Los anticuerpos primarios se diluyeron en tampón de dilución de anticuerpo compuesto de BSA al 0,5 % (p/vol), Tween-20 al 0,1 % (vol/vol) en TBS a 4 °C durante 2 h seguido de detección con el anticuerpo secundario adecuado conjugado con peroxidasa de rábano picante diluido en tampón de dilución de anticuerpo a 4 °C durante 1 h. Después de cada etapa de incubación, las membranas se lavaron extensamente con Tween-20 al 0,1 % en TBS. La inmunoreactividad se determinó usando el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL (Amersham Corp., Arlington Heights, IL).

d. Inhibición de la actividad proteolítica de CCS. Se usó un inhibidor específico de la cisteína proteasa, E-64, para inactivar la actividad proteolítica de CCS. Se incubó CCS (25 $\mu\text{g/ml}$) diluido en ditiotreitol 3 μM , E-64 100 μM , acetato de sodio 60 mM (pH 5), durante 10 minutos a 30 °C. La CCS inactivada después se dializó toda la noche en solución salina a 4 °C. Los estudios anteriores con bromelaína bruta habían mostrado que estas condiciones eran suficientes para inducir 99,5 % de inactivación de la actividad proteolítica cuando se ensayaba con el sustrato Z-Arg-Arg-pNA (véase antes). Los linfocitos T se trataron con CCS inactivada con E-64 (25 $\mu\text{g/ml}$) y se compararon con los linfocitos T tratados con control y no tratados con CCS estimulados con PMA más ionóforo.

RESULTADOS

a. La fracción CCS inhibe la fosforilación de tirosina de p42 kda. Se ha mostrado previamente que la bromelaína bloquea la fosforilación de tirosina de ERK-2 después de estimulación de los linfocitos T con PMA más ionóforo de calcio combinados (documento WO-A-96/00082). La estimulación con éster de forbol y ionóforo de los linfocitos T actúa de forma sinérgica para reproducir muchas características de la estimulación por TCR tales como la secreción de IL-2, expresión del receptor de IL-2 y proliferación de linfocitos T (Truneh y col., 1985, *Nature*, 313, 318-320; Rayter y col., 1992, *EMBO*, 11, 4549-4556). Los ésteres de forbol pueden mimetizar el desencadenamiento de receptores de antígeno y eludir las proteína tirosina quinasa inducidas por los TCR para activar ERK-2 mediante una acción agonista directa en PKC y p21^{Ras}. El ionóforo de calcio A23187 induce mayor liberación intracelular de Ca^{2+} y por lo tanto mimetiza la acción de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3). Sin embargo, los ésteres de forbol y el ionóforo estimulan las rutas de la PKC que no son controladas por los TCR (Izquierdo y col., 1992, *Mol. Cell. Biol.*, 12, 3305-3312) lo que sugiere rutas intracelulares separadas en los linfocitos T, que regulan la función de los linfocitos T. Por lo tanto, se investigó qué fracción de la bromelaína podía bloquear la señalización de los linfocitos T mediante la ruta independiente de TCR, examinando sus efectos en la fosforilación de tirosina inducida por PMA y ionóforo.

La estimulación de los linfocitos T con ionóforo y PMA combinados inducía la fosforilación de tirosina de varias proteínas incluyendo las de alrededor de 100 kda, 85 kda, 42 kda y 38 kda. El tratamiento previo con CCS (50 $\mu\text{g/ml}$) reducía la fosforilación de tirosina de la proteína p42 kda y no inhibía significativamente la fosforilación de ningún otro sustrato (figura 6). En dos experimentos, la CCS, pero no otra fracción, también aumentaba la fosforilación de tirosina de las proteínas de alrededor de 36 kda, 38 kda, 85 kda, 94 kda y 102 kda (figura 7 y figura 8).

La capacidad de la CCS para bloquear la fosforilación de tirosina de la fosfoproteína de 42 kda dependía de la dosis (fig. 8) y dependía de su actividad proteolítica, puesto que E-64 anulaba completamente el efecto inhibitorio de la CCS en la fosforilación de p42 kda (fig. 8). El tratamiento con E-64 de los linfocitos T no afectaba a la señalización de los linfocitos T inducida por PMA y ionóforo.

CCS inhibe la fosforilación de tirosina de ERK-2. Se sospechaba que la fosfoproteína de 42 kda inhibida por CCS era la MAPk ERK-2, por lo que se llevó a cabo el análisis de inmunotransferencia con mAb anti-ERK-2 y anticuerpos anti-fosfo MAPk específicos, que detectan específicamente ERK-1 y ERK-2 sólo cuando son activados catalíticamente por fosforilación en la Tyr204. La inmunotransferencia de células tratadas con CCS que han sido estimuladas con PMA más ionóforo, confirmaba que la fosfoproteína p42 kda era realmente la ERK-2 (fig. 9).

CCS reduce la fosforilación de tirosina de ERK inducida por TCR. Después se investigó el efecto de la CCS en la transducción de señales mediada por TCR por evaluación de la fosforilación de tirosina del sustrato de GA15 estimulada con mAb anti-CD3 ϵ cruzado. Las inmunotransferencias de lisatos de GA15, usando mAb anti-fosfotirosina específicos, pusieron de manifiesto mayor fosforilación de tirosina de múltiples proteínas incluidas las de alrededor de 120 kda, 100 kda, 85 kda, 76 kda, 70 kda, 42 kda y 40 kda, de acuerdo con las fosfoproteínas observadas en otras líneas de linfocitos T después de la unión con TCR (June y col., 1990, *J. Immunol.*, 144, 1591-

1599 y *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 7722-7726, revisado por Cantrell, 1996, *Annu. Rev. Immunol.*, 14, 259-274) (fig. 10). Las proteínas fosforiladas en la tirosina se detectaron fácilmente entre 2 y 5 min después de la estimulación y permanecieron fosforiladas durante al menos 10 min (fig. 10). Las células GA15 estimuladas con mAb anti-CD3 solo o Ab cruzado, no inducían la fosforilación de tirosina de ningún sustrato celular (no se muestran los datos). Otra vez, el tratamiento previo con CCS de GA15 durante 30 min produjo una reducción de la fosforilación de tirosina de proteínas de ERK-2 inducida por TCR de una forma dependiente de la dosis (fig. 11). La CCS no afectó de forma notable la fosforilación de tirosina de otras fosfoproteínas inducida por TCR, lo que sugería que la CCS tiene un modo de acción selectivo.

10 **EJEMPLO 4 - CCS retarda el cambio de movilidad de Raf-1**

Raf-1 es un activador inmediatamente corriente arriba de MEK-1 que activa ERK-2. La activación de Raf-1 requiere la fosforilación en los residuos de serina y treonina específicos (Avruch y col., 1994, *TIBS*, 19, 279-283). Para investigar si la CCS afecta a cualquier otro sustrato corriente arriba de ERK-2 en la cascada de la MAP quinasa, se investigó el efecto de la CCS en Raf-1. Se trataron linfocitos T con CCS (0 a 50 µg/ml) y después se estimularon con mAb anti-CD3ε o PMA más ionóforo combinados como se ha descrito antes. Los resultados muestran que la CCS bloquea el cambio de movilidad de Raf-1, lo que indica que bloquea su fosforilación de proteína y por lo tanto la activación. Estos datos confirman que CCS tiene un efecto en la cascada de la MAP quinasa (fig. 12) y que el efecto de CCS puede no ser directamente en ERK-2, si no en sustratos corriente arriba en la cascada de MAPK.

20

EJEMPLO 5 - Efecto de CCS en la producción de IL-2 y proliferación de linfocitos T

a. Materiales

25 **Células.** Se aislaron esplenocitos de ratones BAL B/c hembra (6-8 semanas de edad) como se ha descrito previamente en el documento WO-A-96/00082. Se aislaron linfocitos T CD4⁺ altamente purificados de los esplenocitos usando la separación de células activadas por magnetismo (MACS).

30 **b. Producción de interleuquina 2.** Los linfocitos T diluidos en RPMI se trataron con CCS (50 µg/ml) o solución salina a 37 °C durante 30 min, se lavaron con RPMI de nueva aportación, y después se volvieron a suspender en medio de cultivo. Los linfocitos T se estimularon para producir R-IL-2 por anticuerpo anti-CD3ε inmovilizado (4 µg/ml) y anticuerpo anti-CD28 soluble (10 µg/ml). Los mAb anti-CD3ε diluidos en PBS se inmovilizaron en placas de microcultivo, de fondo plano, de 24 pocillos (Corning, Corning, NY) por incubación durante 16 h a 4 °C. Después los pocillos se lavaron tres veces en PBS antes de añadir los cultivos triplicados de esplenocitos o linfocitos T CD4⁺ purificados (2,5 - 5 x 10⁶ células por pocillo) que se incubaron a 37 °C en CO₂ al 5 % húmedo durante 24 h. Se midieron los niveles de IL-2 en el líquido sobrenadante del cultivo usando el bioensayo CTL-L (Gillis y col., 1978, *J. Immunol.*, 120, 2027-2032).

35

40 **c. Proliferación de linfocitos T.** Se trataron linfocitos T con CCS (50 µg/ml) durante 30 min, se lavaron en RPMI y después se estimularon con mAb anti-CD3ε inmovilizado solo o mAb anti-CD3ε más mAb anti-CD28 combinados. Después las células se cultivaron en placas de fondo plano de 96 pocillos (Nunc) con 10⁵ células por pocillo durante 36 h. Los cultivos se pulsaron con [³H]TdR 0,5 µCi, 12 h antes de recogerlos en filtros de fibra de vidrio.

RESULTADOS

45

a. CCS inhibe la producción de IL-2 y la proliferación de linfocitos T CD4⁺

La activación de p21^{Ras}, Raf-1, MEK-1 y ERK es esencial para la inducción de la transcripción de IL-2 en linfocitos T (Izquierdo y col., 1993, *J. Exp. Med.*, 178, 1199). La IL-2 es el factor de crecimiento de linfocitos T autocrino principal que induce la proliferación de linfocitos T. Por lo tanto se podía esperar que el defecto en la activación de ERK demostrado aquí, inhibiera la producción de IL-2 y la proliferación de linfocitos T. Por lo tanto, se investigó si CCS podía tener un resultado funcional en la señalización de linfocitos T, en concreto en la producción de IL-2 y la proliferación en esplenocitos murinos y linfocitos T CD4⁺ altamente purificados. El tratamiento con CCS (50 µg/ml) de linfocitos T CD4⁺ purificados redujo tanto la producción de IL-2 como la proliferación cuando la ruta de la ERK era estimulada con mAb anti-CD3ε (fig. 13a y 13b). CCS también bloqueaba la producción de IL-2 por los esplenocitos, sin embargo no afectaba a la proliferación de esplenocitos (fig. 14a y 14b), lo que sugería que un componente en CCS todavía no identificado estaba actuando en las poblaciones de células accesorias en los cultivos de esplenocitos, tales como linfocitos B o macrófagos. La bromelaína puede aumentar las señales coestimuladoras de los linfocitos T por una acción en los linfocitos B. Independientemente del efecto putativo de CCS en las células accesorias, los datos indican claramente que CCS bloquea la producción de IL-2 y la proliferación de linfocitos T CD4⁺ purificados, lo que sugiere que CCS bloquea la activación de los linfocitos T. La producción de IL-2 y proliferación dependen de la estimulación celular con anticuerpos anti-TCR puesto que no se detectó citoquina en las células cultivadas en medios de cultivo tisular solos (fig. 13 y 14).

60

EJEMPLO 6 - Efecto de CCS en el crecimiento de células tumorales humanas in vitro**a. Materiales**

5 **Células.** Las líneas de células tumorales las proporcionaron L. Kelland (Institute of Cancer Research, Sutton, Reino Unido) y eran las siguientes: de ovario (SKOV-3, CH-1, A2780), colon (HT29, BE, LOVO), pecho (MCF-7, MDA231, MDA361), pulmón (A549, CORL23, MOR) y melanoma (G361, BOO8, SKMe124).

10 **b. Inhibición del crecimiento de líneas de células tumorales humanas.** Los estudios los llevó a cabo L. Kelland (Institute of Cancer Research, Sutton, Reino Unido). Se tripsinizaron líneas celulares y se sembraron células viables individuales en placas de microvaloración de 96 pocillos con una densidad de 4×10^3 células/pocillo en 160 μ l de medio de crecimiento. Después de dejar toda la noche para la unión, se añadió CCS a los pocillos por cuadruplicado en 40 μ l de medio de crecimiento para dar un intervalo de concentraciones finales en los pocillos de 50, 10, 2,5, 1 y 0,25 μ g/ml. Ocho pocillos servían como control, pocillos no tratados. Se diluyó la CCS inmediatamente antes de la adición a las células en agua estéril. La exposición a CCS de las células fue durante 96 h, tras lo cual se determinó el número de células en cada pocillo mediante tinción con sulforrodamina B al 0,4 % en ácido acético al 1 % como se ha descrito previamente (Kelland y col., 1993, *Cancer Res.*, 53, 2581-2586). Después se calcularon las concentraciones inhibitoras de 50 % (valores de CI_{50} en μ g/ml) a partir de las gráficas de concentración frente a la absorbancia de control (%) (lectura a 540 nm).

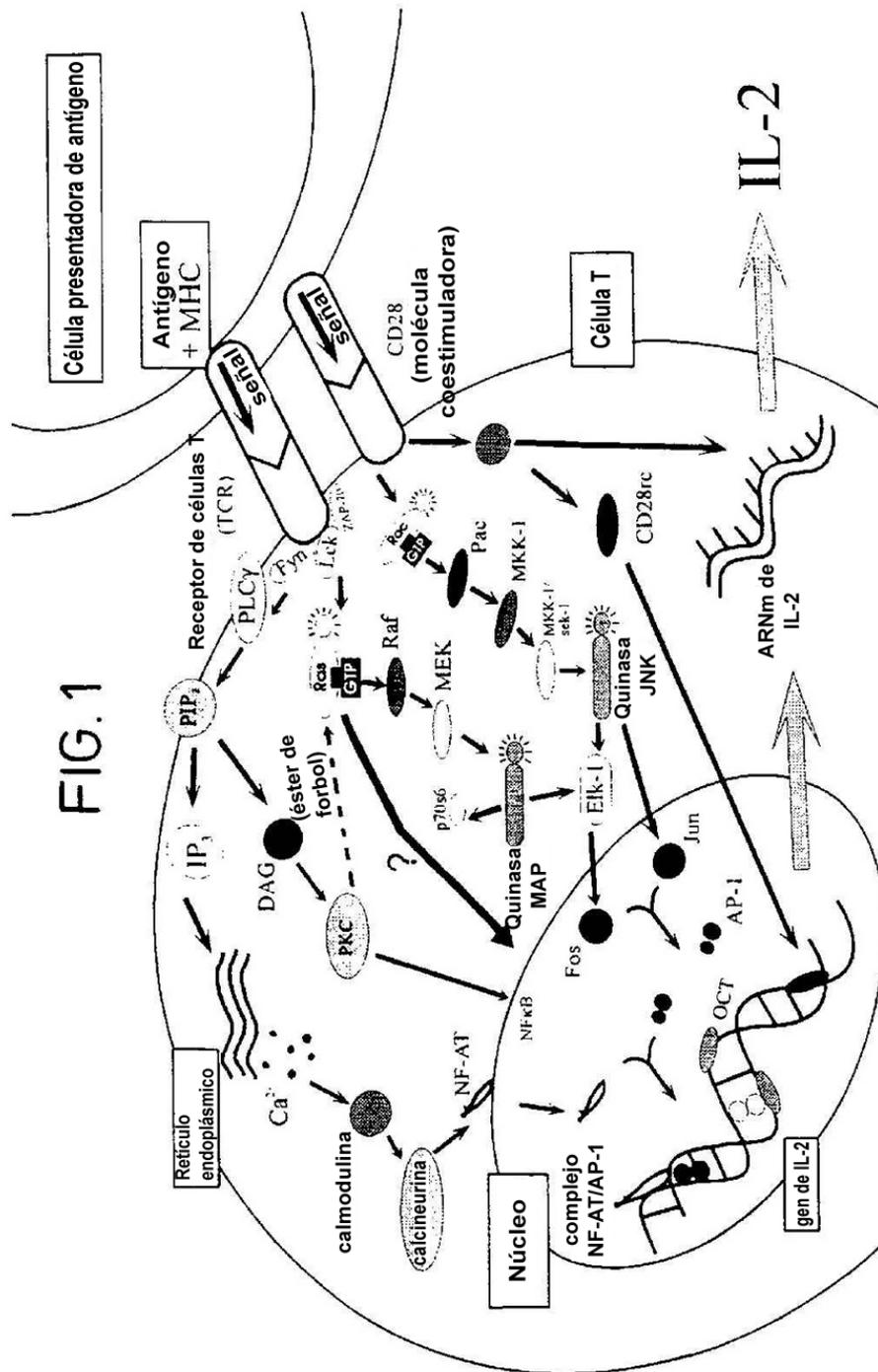
20

RESULTADOS

25 **a. CCS inhibe el crecimiento de tumor humano in vitro.** p21^{Ras} y Raf-1 son oncogenes importantes, que cuando mutan producen el crecimiento y proliferación celulares incontrolados, conduciendo al cáncer. Puesto que se ha demostrado que CCS puede bloquear los efectos de la cascada de señalización de quinasas p21^{Ra}/Raf-1/MEK1/ERK, se investigó si CCS podía bloquear el crecimiento tumoral. El tratamiento con CCS de células tumorales humanas dio como resultado una reducción en el crecimiento de varias líneas celulares tumorales diferentes de ovario, pulmón, colon, pecho y melanoma, in vitro (Fig. 15). La CCS no afectó a todas las líneas celulares por igual, lo que sugería que la CCS tiene una acción selectiva.

REIVINDICACIONES

1. Ananaína o una mezcla de ananaína y comosaína para usar en el tratamiento de un cáncer mediante el bloqueo de las rutas de la quinasa MAP en una célula cancerígena.
5
2. Ananaína o una mezcla de ananaína y comosaína para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el cáncer es un cáncer sólido, un tumor no sólido o leucemia.
3. Ananaína o una mezcla de ananaína y comosaína para usar de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el cáncer sólido es cáncer de ovario, colon, pecho, pulmón o melanoma.
10
4. Ananaína o una mezcla de ananaína y comosaína para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.
5. Ananaína o una mezcla de ananaína y comosaína para usar de acuerdo con la reivindicación 4, en una forma adecuada para la administración entérica, oral, nasal, bucal, tópica o anal.
15
6. Ananaína o una mezcla de ananaína y comosaína para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en una forma adecuada para la administración oral.
20
7. Ananaína o una mezcla de ananaína y comosaína para usar de acuerdo con la reivindicación 4, en una forma adecuada para la administración parenteral.
8. Ananaína o una mezcla de ananaína y comosaína para usar de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la administración parenteral se selecciona de administración intravenosa, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal.
25



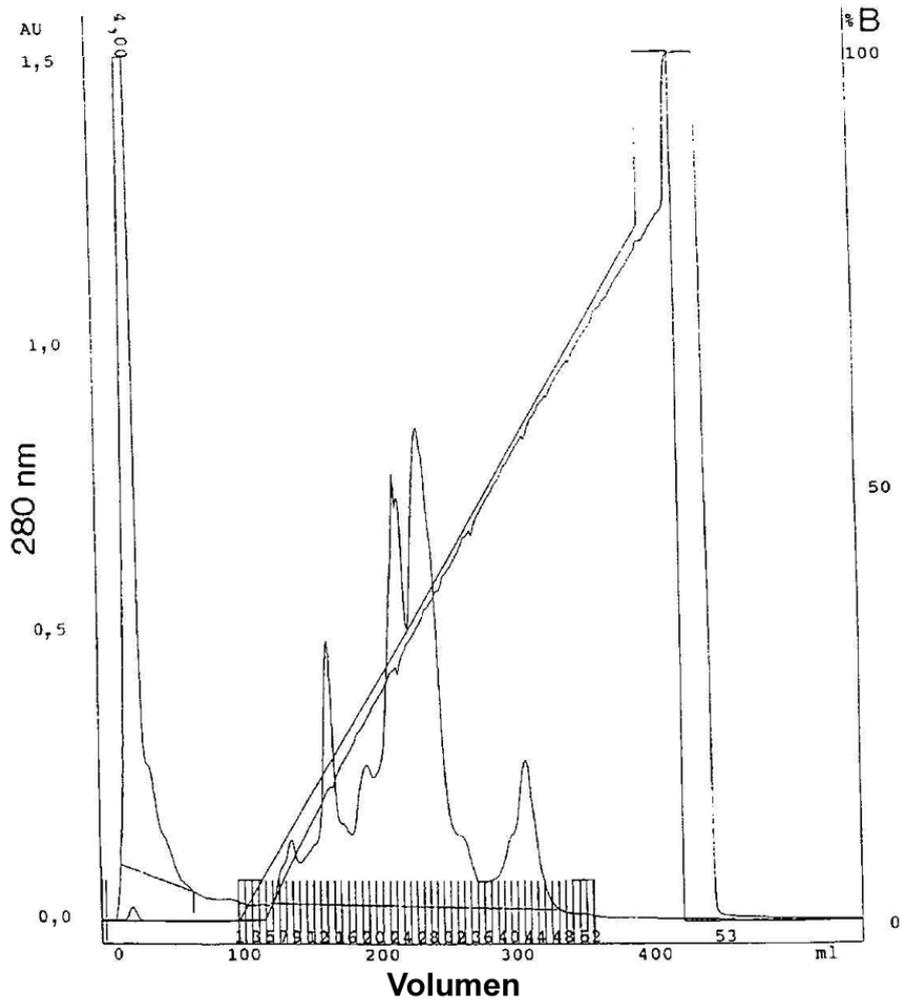


FIG. 2

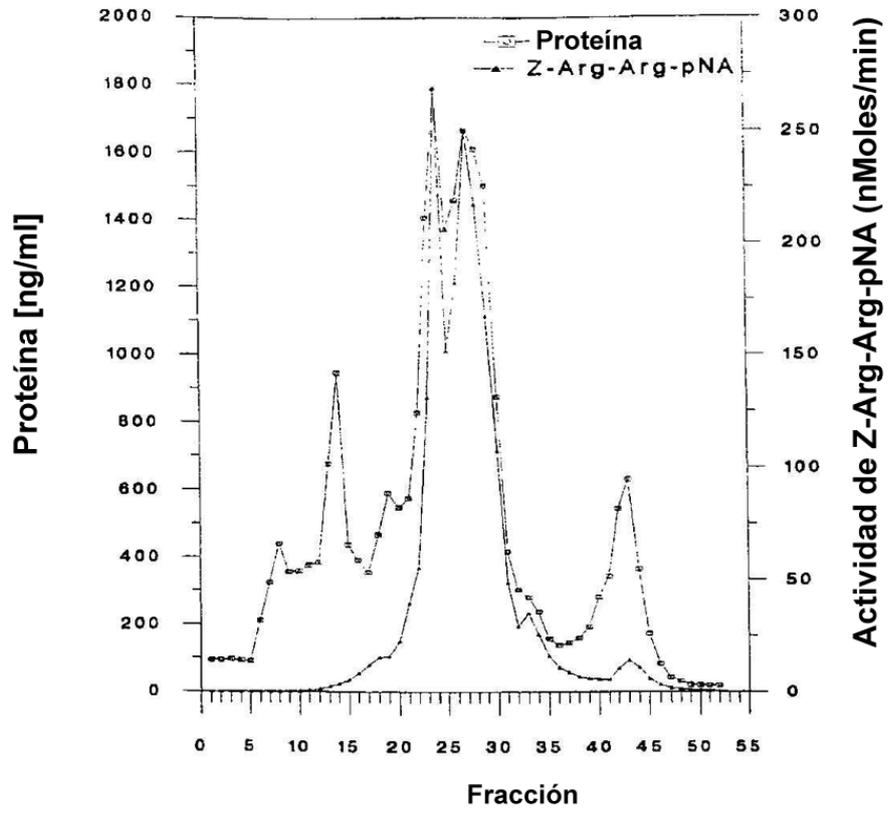


FIG. 3

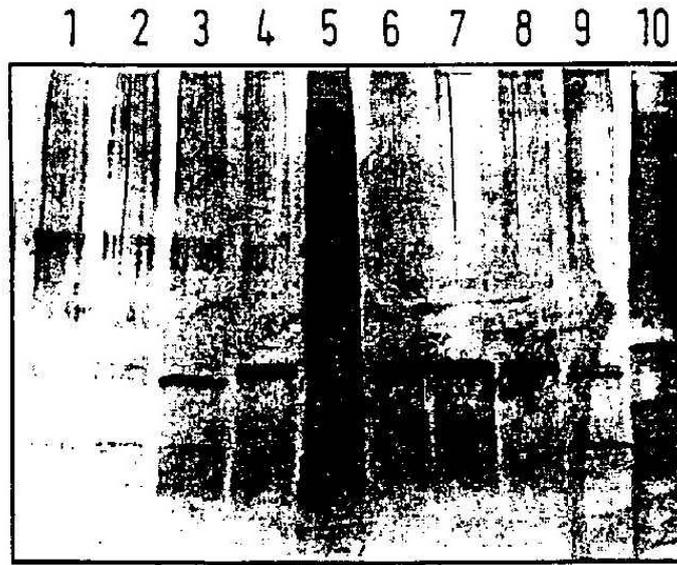


FIG. 4

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

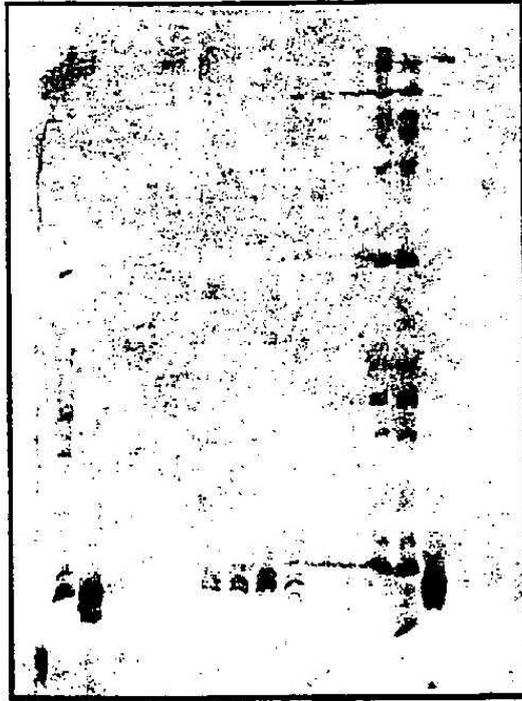
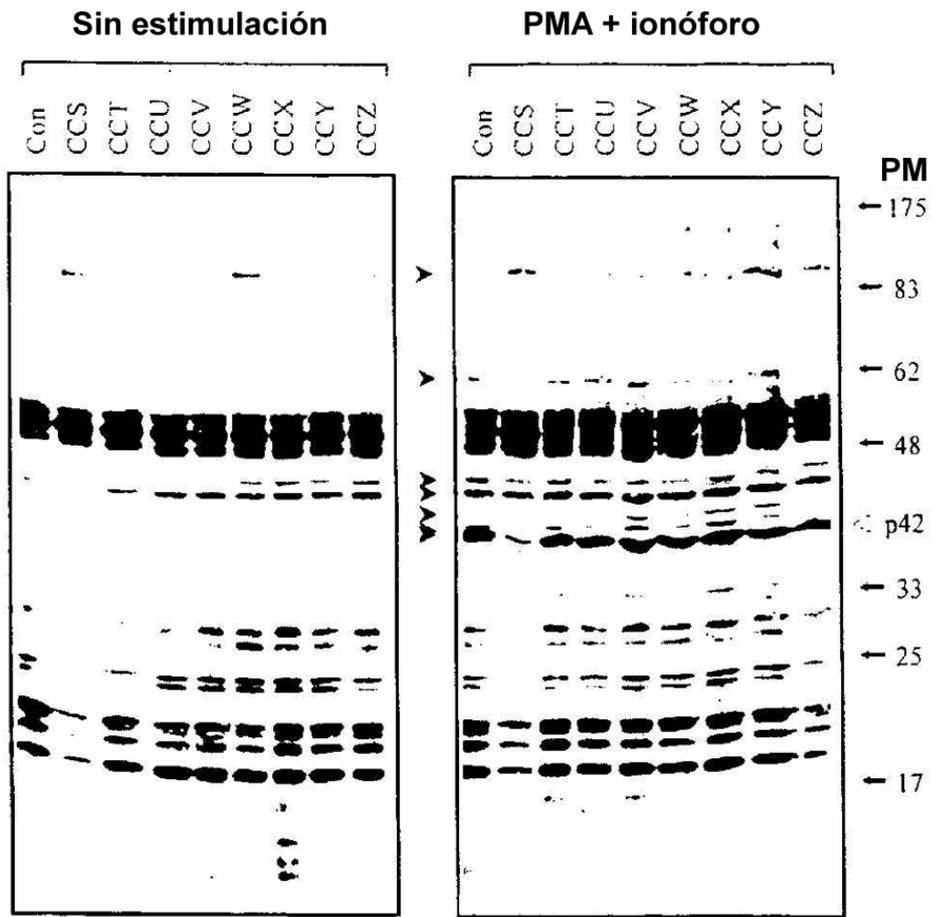
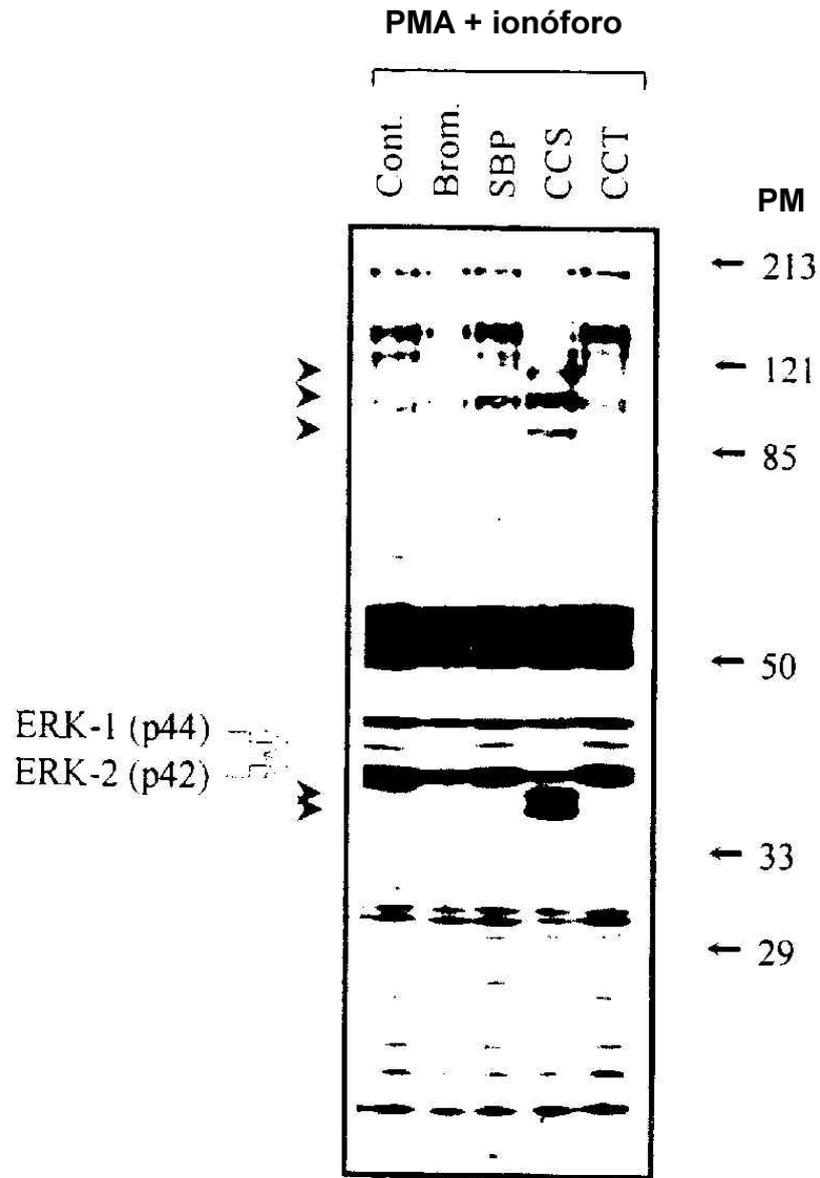


FIG. 5



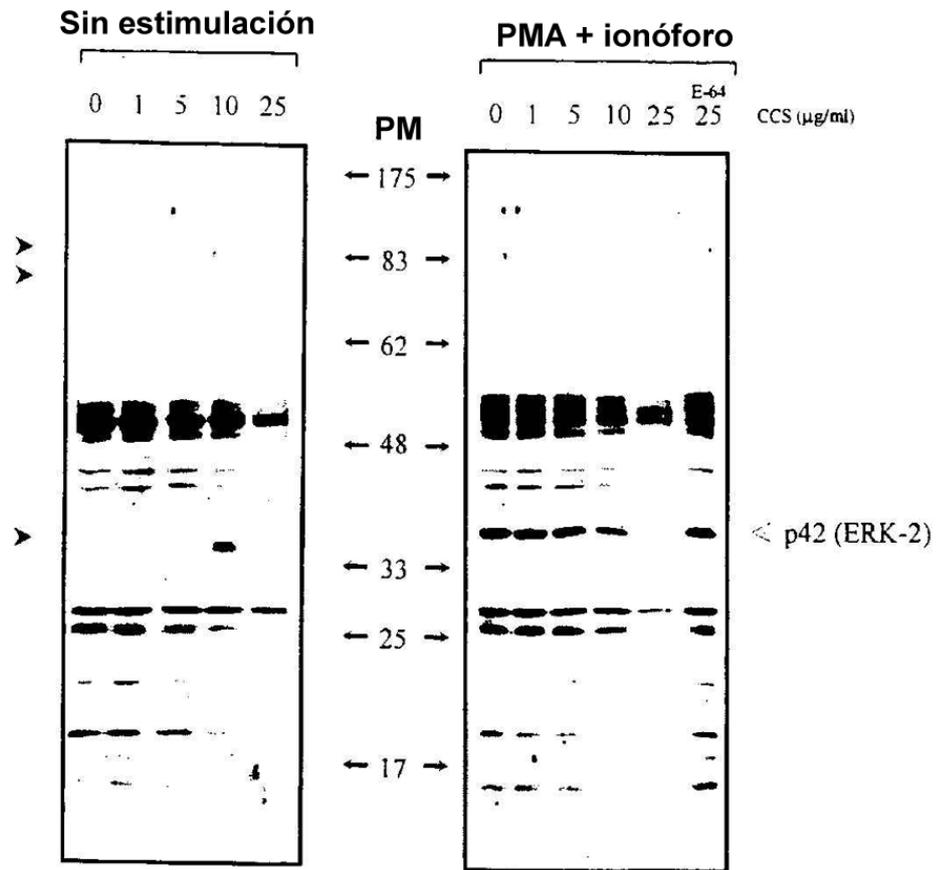
Ab: mAb α -pY

FIG. 6



Ab: mAb α -pY

FIG. 7



Ab: mAb α -pY

FIG. 8

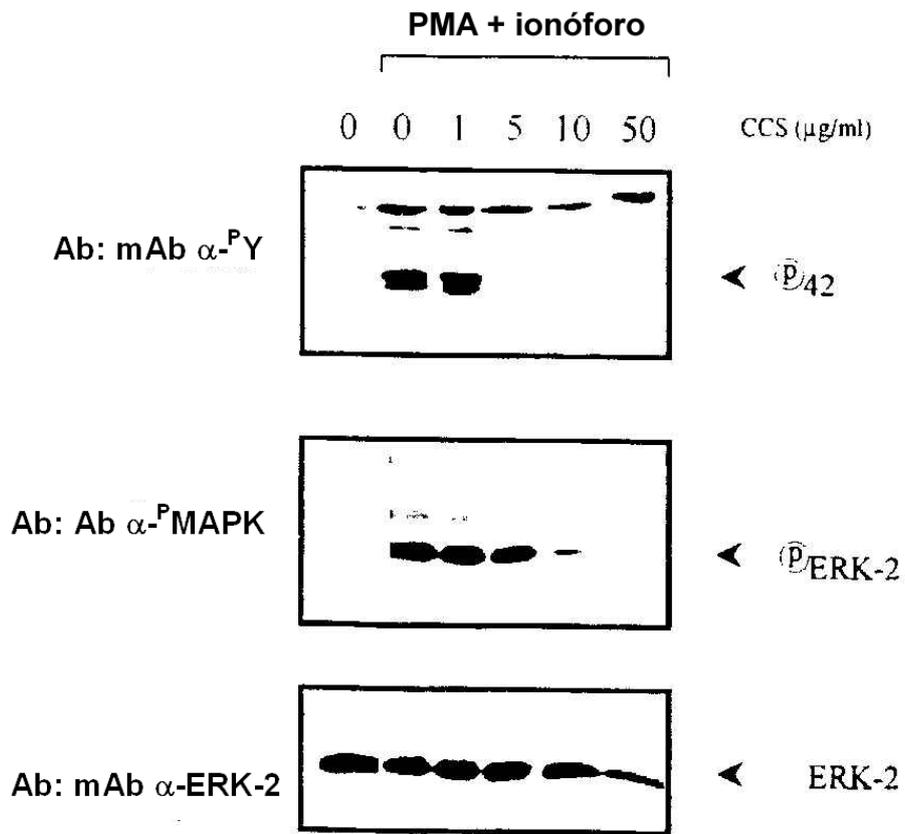
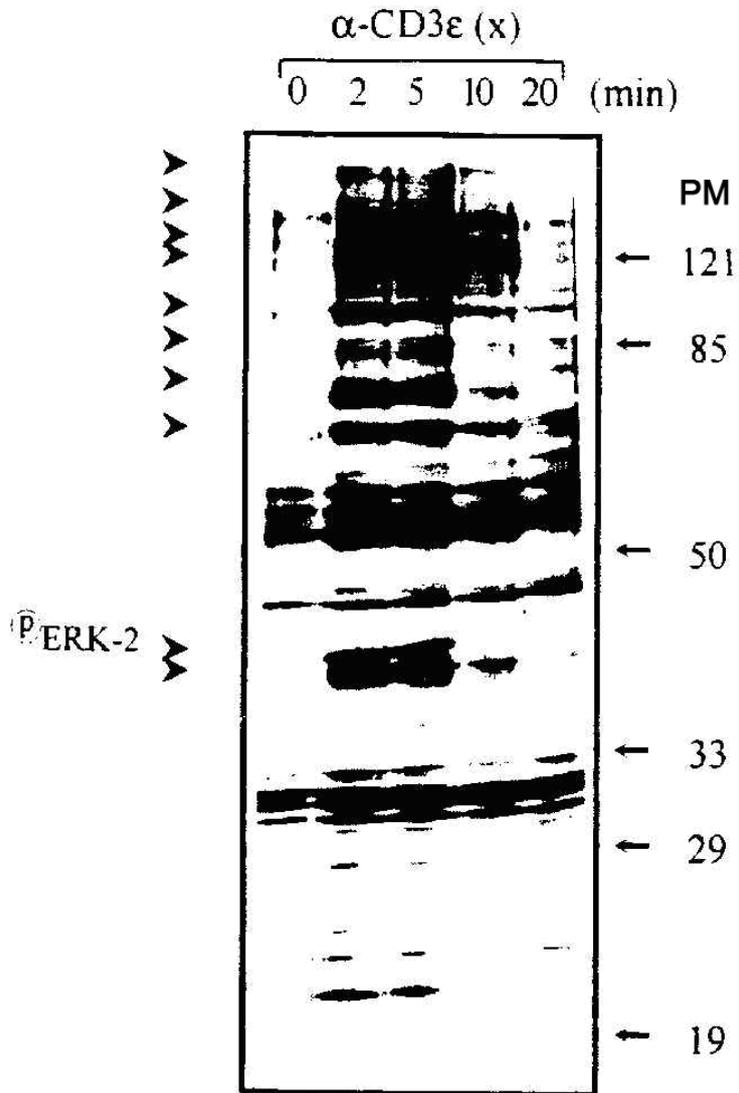


FIG. 9



Ab: mAb α -pY

FIG. 10

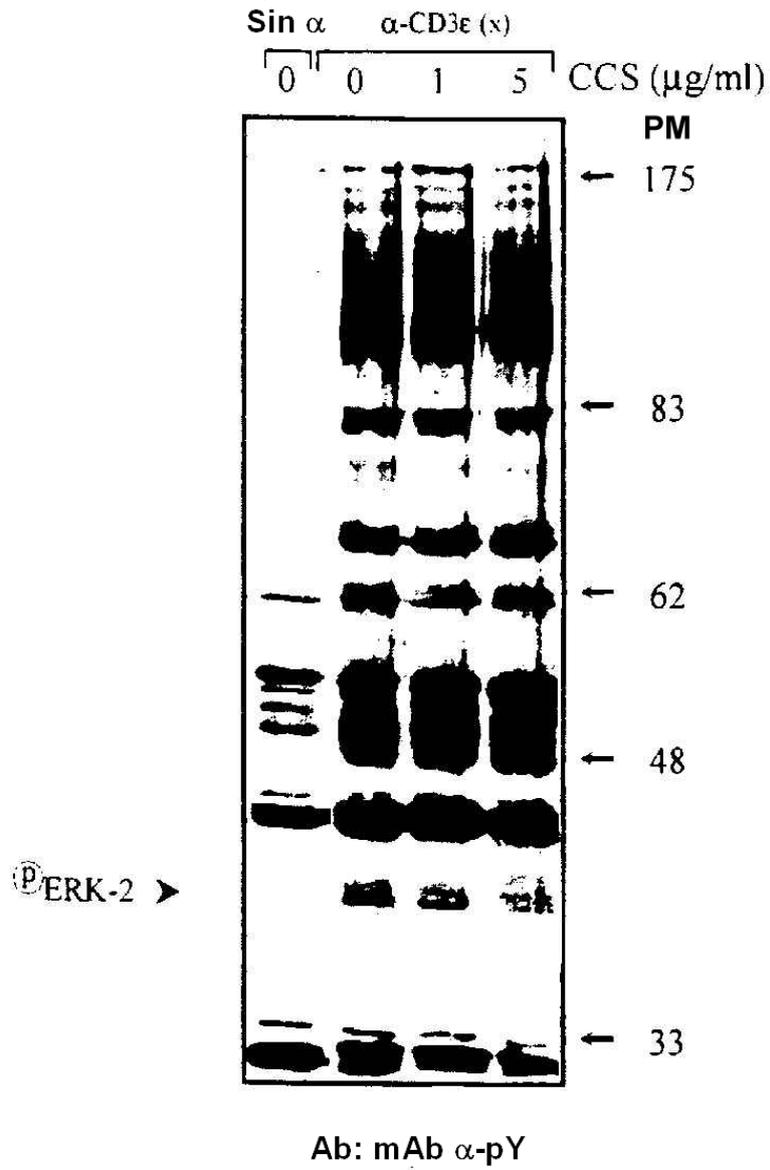


FIG. 11

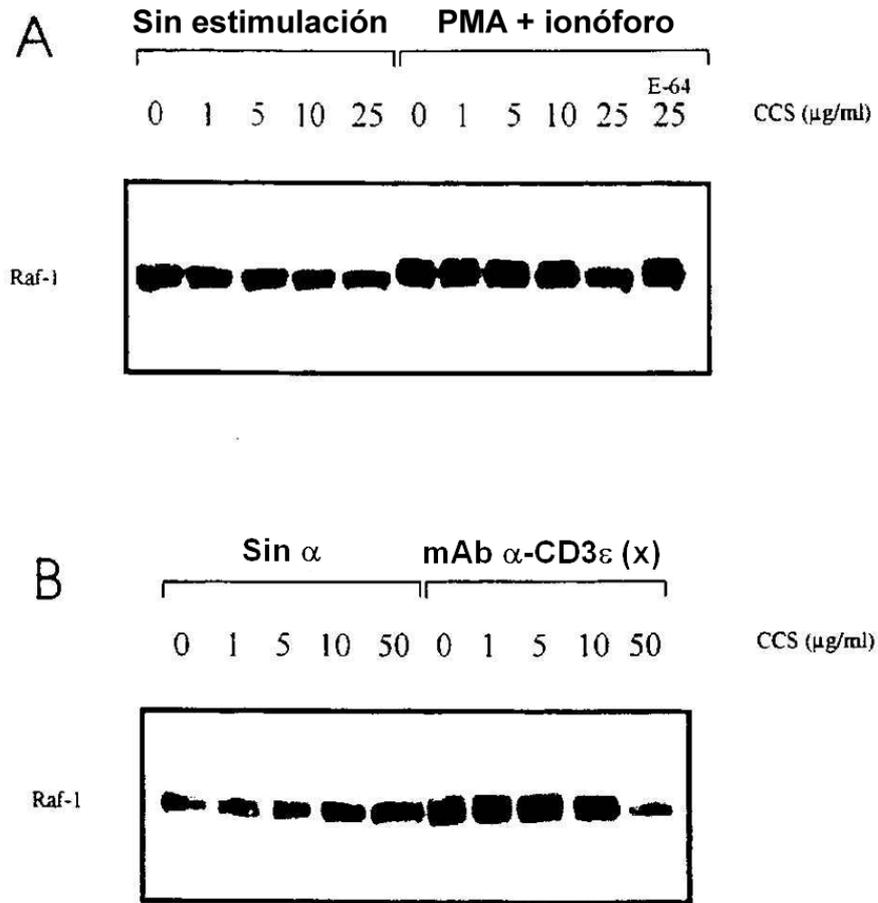
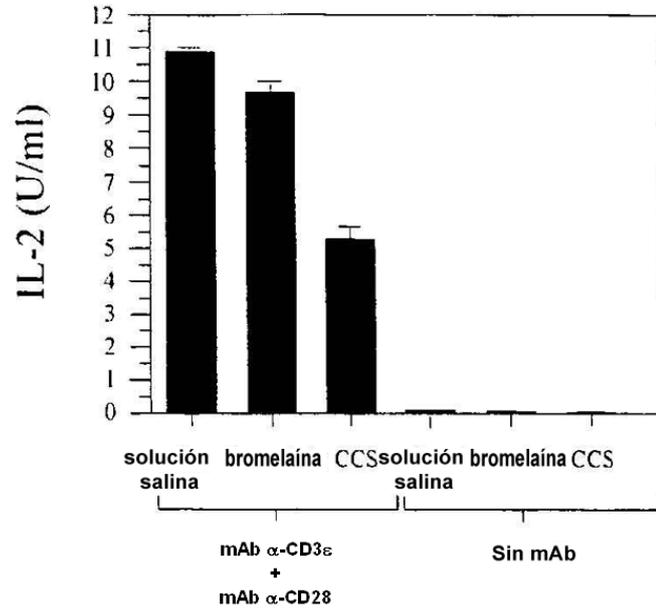


FIG. 12

A.



B.

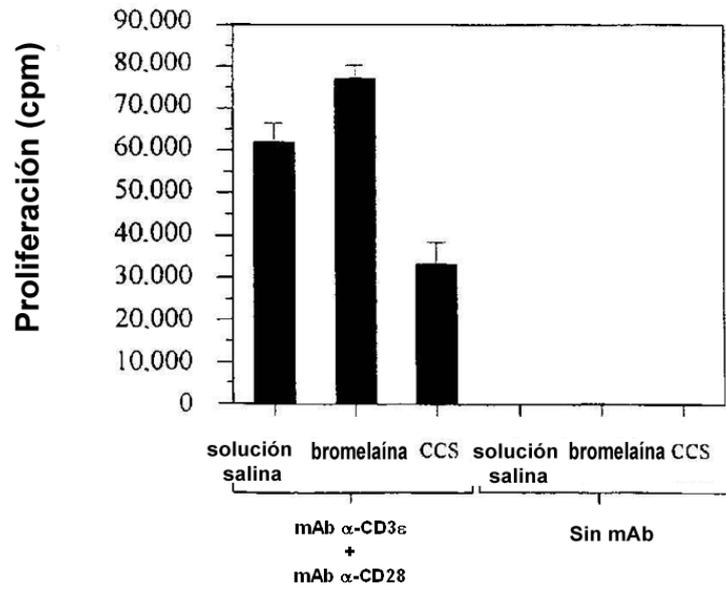
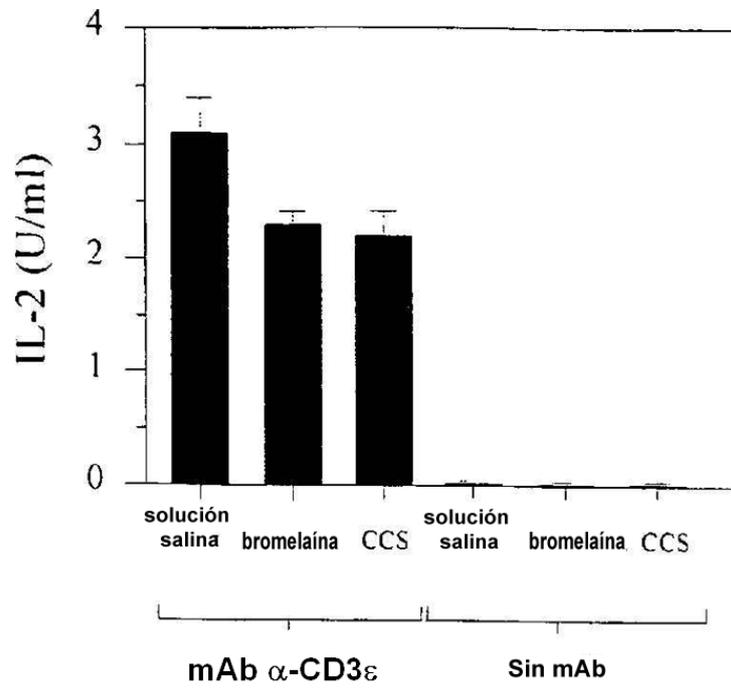


FIG. 13

A.



B.

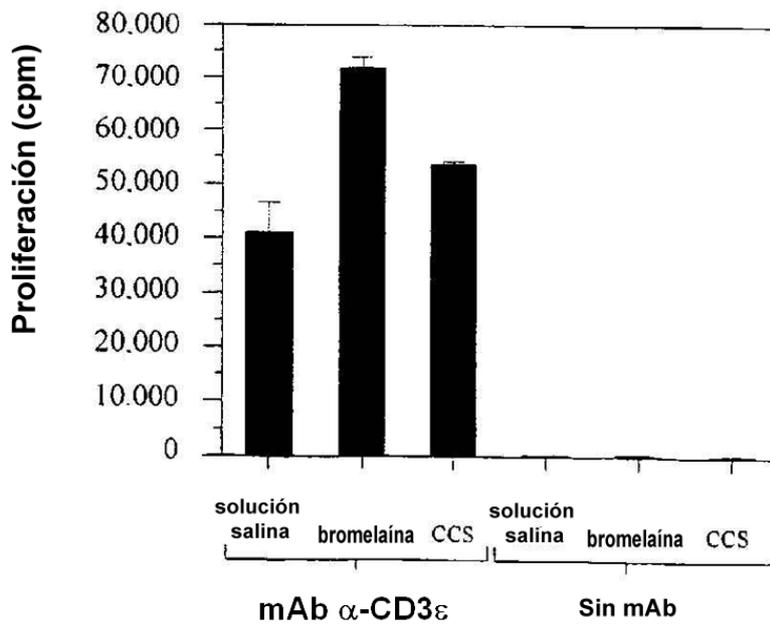


FIG. 14

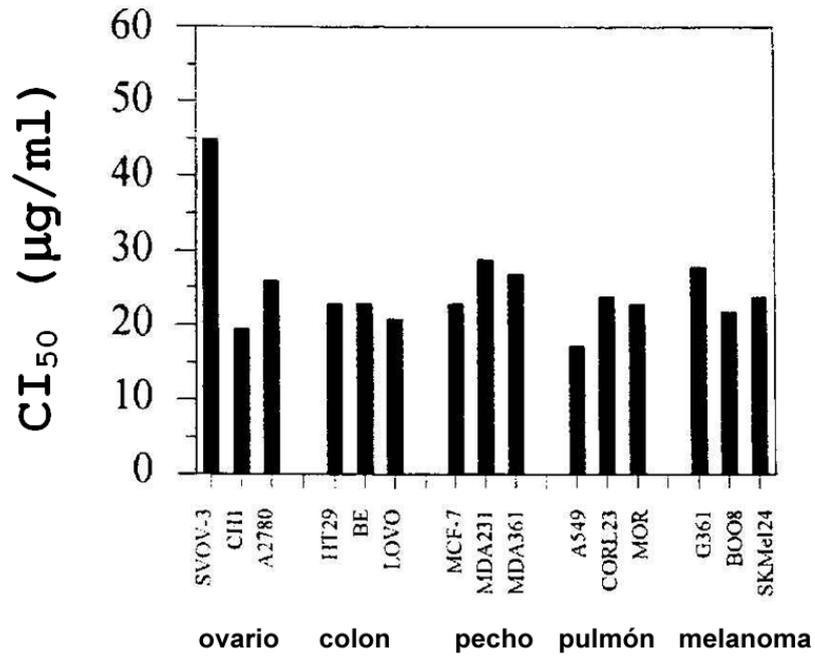


FIG. 15