

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 020**

21 Número de solicitud: 201130324

51 Int. Cl.:

C12N 9/22 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **10.03.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **05.10.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
05.10.2012

71 Solicitante/s:
**UNIVERSITAT DE GIRONA
PLAÇA SANT DOMENEC, 3
17004 GIRONA, ES**

72 Inventor/es:
**VILANOVA BRUGUES, María;
BENITO MUNDET, Antoni;
RIBÓ PANOSA, Marc;
CASTRO GALLEGOS, Jessica;
TUBERT JUHE, Pere y
VERT COMPANY, Anna**

74 Agente/Representante:
Zea Checa, Bernabé

54 Título: **PROTEÍNAS RECOMBINANTES CON EFECTO ANTITUMORAL.**

57 Resumen:

Proteínas recombinantes con efecto antitumoral.

La presente invención proporciona una proteína recombinante con actividad ribonucleasa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 1 fusionada a través de su extremo N-terminal con una secuencia de localización nuclear, así como una molécula de ADN recombinante que codifica para esta proteína, un vector que comprende dicha molécula de ADN y una célula que comprende dicho vector. Adicionalmente la presente invención está referida a un procedimiento para la obtención de la proteína recombinante y el uso de la misma como agente antitumoral.

ES 2 388 020 A1

DESCRIPCIÓN

Proteínas recombinantes con efecto antitumoral.

La presente invención está relacionada con el campo de la medicina, y particularmente con el campo de la oncología. Específicamente se refiere a proteínas recombinantes con actividad ribonucleolítica que presentan un efecto antitumoral.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Algunas enzimas de la familia ribonucleasa (de ahora en adelante denominada RNasas) han suscitado un especial interés debido a su actividad citotóxica, ya que se podrían usar como agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer.

Como ejemplo de RNasa que tienen efecto citotóxico destaca la Onconasa[®] (de ahora en adelante denominada ONC), una RNasa procedente de oocitos y embriones tempranos de *Rana pipiens* que se encuentra en estudios clínicos de fase III como agente antitumoral para el tratamiento de mesotelioma maligno presentando selectividad para células tumorales. Al unirse a la superficie de células tumorales y ser internalizada en el citosol, la ONC causa la muerte celular como resultado de la potente inhibición de la síntesis proteica mediante un mecanismo que implica la degradación del RNA celular. Es conocido que la ONC no es inhibida por el inhibidor proteico de RNasas presente en el citosol de células de mamífero (también denominado IR), lo que explica la mayor citotoxicidad de la ONC en comparación con otras RNasas de mamífero y, por consiguiente, su efecto antitumoral.

Sin embargo, la ONC presenta propiedades no deseables. Debido a su origen no humano, la ONC típicamente estimula respuestas inmunológicas adversas en el hombre y provoca una elevada toxicidad renal. Además, el hecho de que se obtenga a partir de una fuente natural hace todavía más difícil y caro obtener cantidades suficientes de proteína.

Se han utilizado diversas estrategias para obtener RNasas citotóxicas que superen las deficiencias de la ONC. La mayor parte de estas estrategias han estado enfocadas a la obtención recombinante de RNasas humanas resistentes a la acción del IR gracias a la introducción de mutaciones en su secuencia que provocan una deficiencia en su capacidad de unión al IR.

El trabajo publicado por Bosch *et al* (Bosch M, Benito B, Ribó M, Puig T, Beaumelle B, Vilanova M. "A Nuclear Localization Sequence Endows Human Pancreatic Ribonuclease with Cytotoxic Activity". *Biochemistry* 2004, vol. 43, p. 2167-2177) propone una alternativa diferente en tanto que describe una variante de la RNasa pancreática humana (de ahora en adelante RNasa-PH) que, aún siendo sensible al IR, escapa a su acción por ser importada al núcleo, donde el IR no está presente. Esta variante, denominada PE5, incluye mutaciones que determinan la existencia de una señal de localización nuclear bipartita discontinua (Rodríguez M, Benito A, Tubert P, Castro J, Ribó M, Beaumelle B, Vilanova M. "A Cytotoxic Ribonuclease Variant with a Discontinuous Nuclear Localization Signal Constituted by Basic Residues Scattered Over Three Areas of the Molecule". *Journal of Molecular Biology* 2006, vol. 360, p. 548-557). Dicha señal constituye una señal de localización nuclear (de ahora en adelante SLN) no convencional integrada por diferentes residuos básicos, los cuales, a pesar de estar situados en tramos alejados en la secuencia de la proteína, se encuentran próximos en la estructura tridimensional de la misma, lo que permite su interacción con importina alfa y consiguiente importación al núcleo. El resultado es una RNasa modificada con actividad citotóxica frente a líneas celulares de leucemia, carcinoma epidermoide, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, carcinoma cervical y linfoma de Burkitt, entre otros, siendo más activa en líneas tumorales que presentan un fenotipo de multiresistencia a medicamentos antitumorales.

Ventajosamente, la variante PE5 es de origen humano, por lo que presenta menos efectos secundarios que la ONC y otras RNasas citotóxicas de origen no humano. Sin embargo PE5 presenta una actividad citotóxica poco eficiente. En comparación con la ONC, por ejemplo, la actividad de PE5 es entre 5 y 15 veces menor (Bosch *et al*, 2004, supra). La baja eficiencia de PE5 condicionaría un incremento en el coste del tratamiento antitumoral y podría provocar la aparición de otros efectos secundarios dado que serían necesarias dosis más elevadas.

A pesar de los avances antes descritos, es deseable proporcionar agentes y tratamientos más eficientes para los enfermos de cáncer con menos efectos secundarios y a un coste más asequible.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han desarrollado variantes de la RNasa-PH con elevado efecto citotóxico que permiten proporcionar a los enfermos de cáncer un tratamiento antitumoral eficiente, con menos efectos secundarios.

Los inventores han encontrado, sorprendentemente, que la incorporación de una SLN en el extremo N-terminal de la secuencia de una variante de RNasa-PH definida por la SEC ID NO: 1 resulta en una nueva RNasa recombinante

con un efecto citotóxico diez veces superior a la variante original.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a una proteína recombinante con actividad RNasa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 1 fusionada a través de su extremo N-terminal con una SLN, siendo la SEC ID NO: 1

5 KESAAAKFXRQHMDSEXSPSSSTYCNQMMRRRNMTQGRCKPVNTFVHEPLVDVQNVCFQEKVTKNGQGNCYK
SNSSMHITDCRLNRRRRYPNCAYRTSPKERHIIIVACEGSPYVPVHFDASVEDST, donde

X₉ es ácido glutámico (E) o glutamina (Q),

X₁₆ es glicina (G) o ácido aspártico (D), y

X₁₇ es asparaguina (N) o serina (S).

10 Las proteínas recombinantes de la invención son casi idénticas a la RNasa-PH salvaje, por lo que presentan menos efectos adversos que la ONC, a la vez que ejercen un efecto citotóxico comparable a ésta y muy superior a las variantes de las que derivan.

Debido a su efecto citotóxico, las proteínas recombinantes de la invención son útiles como medicamento, en concreto como agentes antitumorales para el tratamiento del cáncer. Así, un segundo aspecto proporciona una proteína recombinante según se define en el primer aspecto de la invención, para uso como medicamento.

De cara a un uso médico, es habitual que los agentes activos sean formulados en composiciones farmacéuticas que contienen excipientes adecuados para su administración en humanos. Así, un tercer aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína recombinante definida en el primer aspecto de la invención junto con cantidades suficientes de excipientes farmacéuticamente aceptables.

20 Un cuarto aspecto de la invención proporciona un procedimiento para la construcción de una proteína recombinante de acuerdo con el primer aspecto de la invención que comprende: a) introducir la secuencia del gen que codifica para la RNasa-PH (nº genbank Gene ID: 6035, actualizado el 13 de enero de 2011) en un vector de expresión, donde dicho vector contiene los elementos necesarios para llevar a cabo la expresión del gen contenido en dicho vector; b) incorporar en el vector resultante del paso (a) una cadena de nucleótidos que codifica para una SLN en el extremo del gen que codifica para la región N-terminal de la RNasa-PH, donde dicha incorporación se lleva a cabo mediante técnicas de mutagénesis en cassette; c) inducir modificaciones en el vector resultante del paso (b) de modo que se obtiene un nuevo vector que comprende la secuencia que codifica para la proteína recombinante definida de acuerdo con la reivindicación 1, donde dichas modificaciones se llevan a cabo mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótido; y d) llevar a cabo la expresión de la secuencia que codifica para la proteína recombinante definida en la reivindicación 1 a partir del vector resultante del paso (c).

La proteína recombinante resultante del paso (d) puede ser posteriormente purificada mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. Como ejemplo, la purificación de RNasas recombinantes se describe en Ribó M, Benito A, Canals A, Nogués MV, Cuchillo C, Vilanova M. "Purification of engineered human pancreatic ribonuclease". *Methods in Enzymology* 2001, vol. 341, p. 221-234.

35 Así, la proteína recombinante con actividad RNasa de la presente invención puede prepararse mediante la expresión en fase de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una SLN y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la cadena polipeptídica definida por SEC ID NO: 1, donde la SLN está situada en el extremo N-terminal de la SEC ID NO: 1, y donde la SEC ID NO: 1 es una variante de la RNasa-PH, seguida si es necesario de la purificación de la proteína así expresada.

40 Otros aspectos de la invención proporcionan una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para la proteína recombinante definida en el primer aspecto de la invención, un vector de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica para dicha proteína recombinante y una célula hospedadora que comprenda dicho vector.

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 en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 FIG. 1. Citotoxicidad de dos producciones independientes de la variante PM5SLNβ4-β5 frente a diversas líneas celulares. A, producción 1; B, producción 2. En cada gráfica se indica el porcentaje de células vivas (eje de

ordenadas) respecto a la concentración de proteína ensayada (eje de abscisas). La FIG. 1 se corresponde con los resultados del apartado 2.1.

5 FIG. 2. Citotoxicidad de una tercera producción independiente (producción 3) de la variante PM5SLN β 4- β 5 frente a diversas líneas celulares. En cada gráfica se indica el porcentaje de células vivas (eje de ordenadas) respecto a la concentración de proteína ensayada (eje de abscisas). La FIG. 2 también se corresponde con los resultados del apartado 2.1.

10 FIG. 3. Inhibición de las proteínas recombinantes y ONC a causa del IR. El ensayo se llevó a cabo incubando las proteínas recombinantes que se indican, con (+) o sin (-) IR, en presencia del sustrato (rRNA). 1, PE10 + IR; 2, PE10 - IR; 3, PE5 + IR; 4, PE5 - IR; 5, SLNPE5 + IR; 6, SLNPE5 - IR; 7, ONC + IR; 8, ONC - IR; 9, control negativo sin proteína recombinante + IR. La FIG. 3 se corresponde con los resultados del apartado 2.2.

FIG. 4. Degradación de RNA nuclear en células HeLa tratadas con ONC y SLNPE5. 1, control (células HeLa no tratadas); 2, ONC; 3, SLNPE5. La FIG. 4 muestra los resultados del apartado 2.3.

EXPOSICIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN

Definiciones

15 Una "secuencia de localización nuclear" o "SLN" es una secuencia de aminoácidos cuya función es permitir la importación al núcleo de una proteína que se encuentra en el citosol mediante la interacción con proteínas citosólicas que interaccionan con receptores específicos que se encuentran en la membrana nuclear. Las SLNs mejor
20 caracterizadas están compuestas por una o más agrupaciones de aminoácidos básicos, si bien no corresponden a una secuencia de consenso específica, y se clasifican por lo general en dos grupos llamados SLN monopartitas, que contienen una sola agrupación de aminoácidos básicos, y SLN bipartitas, que contienen dos agrupaciones básicas separadas por un segmento de 10-12 aminoácidos no conservados. Mayoritariamente se trata de secuencias
25 lineales. Además de estos tipos de SLNs, pueden existir otro tipo de SLNs menos convencionales definidas por aminoácidos que, si bien están situados en tramos alejados en la secuencia de la proteína, se encuentran próximos en la estructura tridimensional de la misma, lo que posibilita su interacción con proteínas que a su vez interaccionan con receptores de membrana responsables de la importación nuclear. Estas SLN se llaman aquí "SNL no convencionales".

30 El término "secuencia de ácidos nucleicos" se refiere a un polímero de ADN o ARN en forma de cadena única o doble y, a menos que esté limitado de otra manera, que abarca análogos conocidos de nucleótidos naturales que se hibridan con ácidos nucleicos de una manera similar a los nucleótidos naturales. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácidos nucleicos incluye su secuencia complementaria.

El término "secuencia de aminoácidos" se refiere a un polímero de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos en forma de cadena única y, a menos que esté limitado de otra manera, que abarca análogos conocidos de aminoácidos naturales. Un "polipéptido" está constituido por una secuencia de aminoácidos de tamaño variable.

35 Por "ADN recombinante" se entiende una molécula de ADN artificial formada de manera deliberada *in vitro* por la modificación de secuencias de ADN o por la unión de secuencias de ADN que normalmente no se encuentran juntas. La construcción de ADN recombinante y la sucesiva expresión de dicho ADN da como resultado la producción de proteínas recombinantes que contienen modificaciones deseadas con respecto a las proteínas originales.

40 Un "vector de expresión" incluye un cassette de expresión que comprende un ADN recombinante que codifica para un polipéptido de acuerdo con la invención que puede ser transcrito y traducido por una célula hospedadora. El cassette de expresión recombinante es un constructo de ácidos nucleicos, generado por recombinación o sintéticamente, con una serie de elementos especificados de ácidos nucleicos que permite la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula hospedadora. El vector de expresión recombinante puede ser parte de un plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la parte de cassette de expresión recombinante del vector de expresión incluye un ácido nucleico a ser transcrito y un promotor operablemente ligado al mismo.

45 Una célula hospedadora es una célula que comprende un vector de expresión y que es capaz de expresar una o varias proteínas recombinantes codificadas por la secuencia de ADN de dicho vector.

El término "aislado" según la presente invención se refiere al material biológico que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su ambiente natural.

50 Según la invención, "modificaciones conservativas" sobre una secuencia particular de ácidos nucleicos se refiere a aquellas modificaciones que dan como resultado una secuencia que codifica para un polipéptido con propiedades similares al codificado por la secuencia de ácidos nucleicos original, siempre y cuando dichos cambios no afecten a la actividad y propiedades del polipéptido en cuestión.

Adicionalmente, es conocido que debido a la degeneración del código genético un aminoácido puede estar codificado por más de un triplete o codón. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina.

5 “Aminoácidos derivados” son aquellos que contienen modificaciones químicas en el aminoácido. Aminoácidos derivados potencialmente interesantes son aminoácidos amidados, acetilados, sulfatados, fenilados, alquilados fosforilados, glicosidados u oxidados.

10 Por “excipiente farmacéuticamente aceptable” se refiere a compuestos que, de acuerdo con un criterio médico, son adecuados para su uso en un sujeto, humano o no humano, sin toxicidad excesiva, irritación, reacción alérgica u otro tipo de problema o complicación para el sujeto. Los excipientes de una composición farmacéutica también deben ser “aceptables” en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para cualquier tipo de composición pueden encontrarse en textos estándar de ciencias farmacéuticas.

La presente invención está relacionada con RNAsas recombinantes derivadas de la RNasa-PH que presentan un elevado efecto citotóxico y son bien toleradas por el cuerpo humano, evitando efectos secundarios indeseables.

15 Los inventores han encontrado que la secuencia SEC ID NO: 1 fusionada en su extremo N-terminal con una SLN da como resultado proteínas recombinantes con actividad ribonucleolítica que poseen una actividad citotóxica muy superior la las RNAsas de las que derivan. Tal y como se demuestra en el ejemplo 2.1, las proteínas recombinantes de la invención ejercen un efecto citotóxico aproximadamente 10 veces mayor que las RNAsas de las que derivan. Esto supone una clara ventaja de cara al uso en terapia anticancerígena, ya que las proteínas recombinantes según
20 la invención consiguen el mismo efecto antitumoral a dosis más bajas. Esto implica menores efectos secundarios en el paciente, además de un ahorro sustancial en el coste de la terapia.

Las proteínas recombinantes según la invención se caracterizan por ser importadas de manera eficiente al núcleo celular, de tal manera que ejercen su actividad ribonucleolítica principalmente en el núcleo de la célula. Esta característica condiciona que estas RNAsas recombinantes posean una elevada actividad citotóxica.

25 Las proteínas recombinantes de la invención tienen en común que comprenden la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 1 fusionada en su extremo N-terminal con una SLN. Las proteínas definidas por la SEC ID NO: 1 derivan de la RNasa-PH nativa mediante modificaciones puntuales en la secuencia de la misma. En estas variantes, la posición 9 de la SEC ID NO: 1 puede estar ocupada por ácido glutámico o por glutamina, la posición 16 puede ser glicina o ácido aspártico, y la posición 17 puede ser asparagina o serina.

30 Las variantes definidas por la SEC ID NO: 1 contienen una secuencia de localización nuclear discontinua no convencional definida por los residuos de Lys1, Arg31, Arg32, Arg33, Arg89, Arg90 y Arg91. Esta SLN no convencional favorece la importación de la variante RNasa al núcleo de la célula, de modo que las RNAsas definidas por SEC ID NO: 1 ya poseen cierto efecto citotóxico, si bien, como se ha comentado anteriormente, este efecto es insuficiente de cara a una aplicación terapéutica.

35 El diseño de variantes de RNasa de procedencia humana con actividad citotóxica para aplicaciones terapéuticas no es sencillo. Esto se debe a que el efecto citotóxico de una RNasa es el resultado de multitud de características de la proteína, tales como su estabilidad, su eficiencia en la internalización y en la translocación al citosol, su capacidad para evadir al IR y su actividad catalítica. Cualquier modificación introducida en la secuencia de la proteína podría afectar a una o varias de estas características. Por eso no hay una clara asociación entre una modificación
40 determinada y un incremento en la actividad antitumoral de una RNasa como consecuencia de la modificación.

Así, las modificaciones en la secuencia de las RNAsas de SEC ID NO: 1 podrían provocar un cambio conformacional que dificulte el reconocimiento por la importina, lo que supondría también una menor importación al núcleo y la pérdida de citotoxicidad. Este efecto no deseado ha sido descrito por Tubert *et al* (Tubert P, Rodríguez M, Ribó M, Benito A, Vilanova M. “The nuclear transport capacity of a human-pancreatic ribonuclease variant is critical for its cytotoxicity”. *Invest. New. Drugs.* 2010, DOI 10.1007/s10637-010-9426-2), quienes observaron una disminución de la actividad citotóxica de la variante denominada PE5 cuando se eliminaban los residuos que conforman la SLN no convencional de esta enzima. Por otro lado, las modificaciones podrían afectar al centro activo de la enzima provocando la pérdida de actividad ribonucleolítica de la misma. Así, parece que las RNAsas citotóxicas derivadas de RNasa-PH nativa deben mantener un difícil equilibrio entre su estabilidad, actividad ribonucleolítica y capacidad de
50 importación en el núcleo. La modificación de la secuencia de las RNAsas podría interferir en cualquiera de estos factores disminuyendo su actividad citotóxica.

En algunos casos, se ha logrado dirigir moléculas al núcleo mediante la incorporación de varias SLN. Por ejemplo, la US5674977 describe un octapéptido ramificado sintético como vehículo de direccionamiento de fármacos a un compartimento celular deseado. Cuando el compartimento celular de destino es el núcleo celular, el octapéptido
55 incorpora varias copias del SLN del antígeno mayor de SV₄₀. Según US5674977, la internalización al núcleo requiere

- de la incorporación de múltiples SLN en la secuencia del octapéptido. Otro documento (Chen P, Wang J, Hope K, Jin L, Dick J, Cameron R, Brandwein J, Minden M, Reilly R M. "Nuclear Localizing Sequences Promote Nuclear Translocation and Enhance the Radiotoxicity of the Anti-CD33 Monoclonal Antibody HuM195 Labeled with ¹¹¹In in Human Myeloid Leukemia Cells". *J Nucl Med* 2006, vol. 47, p. 827–836), describe que la importación al núcleo del anticuerpo monoclonal HuM195 marcado con ¹¹¹In (anticuerpo anti-CD33) se triplica cuando se conjuga con cuatro SLN, y es seis veces mayor cuando se conjuga con ocho SLN. Los resultados muestran que es necesario conjugar dicho anticuerpo con una media de cinco SLN para obtener una actividad citotóxica dos veces mayor en comparación con el anticuerpo no conjugado. Así, parece que esta estrategia es poco eficiente para el direccionamiento de las moléculas al núcleo de la célula.
- El escaso éxito del direccionamiento al núcleo mediante SLNs queda ilustrado en el caso de RNAsas citoplasmáticas en el ejemplo 2.1., donde se muestra que la incorporación de una SLN en una RNasa recombinante denominada PM5 no incrementa en modo alguno su citotoxicidad, y esto independientemente de dónde se incorpore la SLN. Del mismo modo, la inserción de una SLN en el extremo C-terminal de una RNasa definida por la SEC ID NO: 1 (PE5NLS) resulta en una variante cuya actividad citotóxica no es significativamente superior a la RNasa de la cual deriva (PE5), demostrando así que la SLN no favorece su importación al núcleo de la célula (ver tabla 1).
- Inesperadamente, tal y como muestra en la tabla 1, la incorporación de una única secuencia de localización nuclear en el extremo N-terminal de una RNasa definida por la SEC ID NO: 1 (NLSPE5) resulta en una variante cuya citotoxicidad es aproximadamente diez veces superior a la RNasa de la cual deriva (PE5).
- Son parte de la presente invención proteínas que contengan modificaciones conservativas con respecto a las proteínas recombinantes definidas en el primer aspecto de la invención. Estas modificaciones no deben disminuir sustancialmente la actividad citotóxica de las proteínas.
- También forman parte de la invención proteínas recombinantes, según el primer aspecto de la invención, modificadas mediante la sustitución de algunos aminoácidos por aminoácidos derivados. Estas modificaciones no deben disminuir la actividad catalítica de la enzima ni su capacidad para ser importada al núcleo celular.
- Los aminoácidos que componen la SEC ID NO: 1 pueden tener configuración L o D. Aquellos con configuración D son más resistentes a la degradación por proteasas.
- En una realización particular del primer aspecto de la invención, la SEC ID NO: 1 de la proteína recombinante contiene ácido glutámico en X₉, glicina en X₁₆, y asparagina en X₁₇. La secuencia particular que contiene dichos residuos se denomina de ahora en adelante PE5. En otra realización particular, X₉ es glutamina, X₁₆ es ácido aspártico, y X₁₇ es serina constituyendo una secuencia particular denominada de ahora en adelante PE10. La PE10 presenta la ventaja adicional con respecto a la PE5 de que es más parecida a la RNasa-PH salvaje, es decir, es una proteína más humanizada que provoca menores reacciones adversas en el cuerpo humano.
- La SLN que se fusiona con la SEC ID NO: 1 según el primer aspecto de la invención puede ser una SLN monopartita, bipartita, o cualquier SLN que no interfiera con la actividad de la enzima. En una realización particular, la SLN que se fusiona con la SEC ID NO: 1 es la SLN del antígeno mayor del virus SV₄₀ con SEC ID NO: 2. En otra realización particular la SLN está definida por la secuencia SEC ID NO: 3. En otra realización particular la SLN está definida por la secuencia SEC ID NO: 4
- En una realización preferida, la proteína recombinante de la invención está definida por la SEC ID NO: 10. En otra realización preferida, la proteína recombinante está definida por la SEC ID NO: 14.
- La construcción de proteínas recombinantes de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo empleando técnicas conocidas en el campo de la biología molecular. Típicamente se preparará en primer lugar el ácido nucleico recombinante que codifica para la proteína recombinante según la invención mediante la restricción y el clonado de secuencias apropiadas. La secuencia de ADN comprende la secuencia que codifica para la SEC ID NO: 1, y un SLN, ambas secuencias situadas en fase. La SEC ID NO: 1 y la secuencia SLN pueden estar separadas por una secuencia espaciadora. Las secuencias espaciadoras están constituidas típicamente por residuos serina, glicina y / o alanina (espaciador no rígido) o secuencias que contengan residuos de prolina (espaciador rígido). Las secuencias espaciadoras pueden ser más o menos largas, si bien habitualmente contienen entre 4 y 8 residuos.
- Típicamente la secuencia de ADN recombinante está contenida en un vector de expresión. A continuación se introduce el ADN recombinante en un hospedador adecuado para conseguir la expresión de la proteína recombinante. El experto en la materia seleccionará el vector de expresión más adecuado teniendo en cuenta las características de la proteína recombinante a expresar y el hospedador que se va a utilizar. Finalmente la proteína recombinante se purifica empleando cromatografía de intercambio iónico o cualquier otro método de purificación conocido en el estado de la técnica. En caso de que la proteína recombinante sea inactiva debido, por ejemplo, a un plegamiento defectuoso de la misma, el experto en la materia aplicará métodos conocidos en la técnica para proceder al plegamiento y subsiguiente activación de dicha proteína.

Con el objeto de facilitar la purificación de la proteína recombinante es habitual introducir en un extremo de la proteína una secuencia de aminoácidos especialmente diseñada para tal fin. Una secuencia de aminoácidos que se puede introducir en la proteína recombinante para facilitar su purificación es una secuencia de polihistidina (His-Tag). Estas secuencias His-Tag son ampliamente usadas para la purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad. Otras secuencias que facilitan la purificación que pueden usarse en la presente invención son, por ejemplo, secuencias antigénicas como la hemaglutinina, T7, GST o myc.

El gen que codifica para la proteína recombinante según la invención también puede prepararse por síntesis química. La síntesis química produce un oligonucleótido de una sola cadena. Esta puede convertirse en un ADN de cadena doble mediante hibridación con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una ADN polimerasa utilizando la cadena única como molde. Aunque la síntesis química se limita a secuencias de aproximadamente 100 bases, pueden obtenerse secuencias más largas ligando entre sí las secuencias más cortas.

Existen otras opciones para producir la proteína recombinante de la invención, tales como por escisión o fusión de polipéptidos sintéticos o semisintéticos. También se puede obtener la proteína recombinante mediante una combinación de las técnicas arriba descritas.

En los ejemplos que se reproducen más adelante se describe la construcción de algunas proteínas recombinantes según la invención.

Las proteínas recombinantes de la invención son útiles como medicamento en terapia anticancerígena por su elevada citotoxicidad. El efecto citotóxico de estas proteínas frente a líneas celulares de carcinoma cervical, linfoma mieloide, carcinoma de ovario y de pulmón queda demostrado en el ejemplo 2.1. Así, una realización preferida de la invención proporciona una proteína recombinante según lo descrito para uso como agente antitumoral. Las proteínas recombinantes según la invención se pueden usar para el tratamiento de leucemia, carcinoma epidermoide, carcinoma de mama, carcinoma cervical, linfoma mieloide, carcinoma de ovario, páncreas, hígado y pulmón. Asimismo, es importante resaltar que las proteínas recombinantes de la invención presentan *in vitro* mayor efecto para líneas celulares tumorales con fenotipo de multiresistencia a medicamentos, es decir representativas de estadios avanzados de cánceres.

Así, una realización preferida proporciona una proteína recombinante según la invención para uso en el tratamiento del cáncer. Esta realización se puede reformular como el uso de la proteína recombinante de la invención para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer. La invención también proporciona un método de tratamiento del cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína recombinante de la invención. En una realización preferida la proteína recombinante es para el tratamiento de todo tipo de cáncer que responda a la terapia, principalmente cáncer de ovario, pulmón y mama.

La actividad antitumoral de estas proteínas puede reforzarse empleando estrategias bien conocidas en el estado de la técnica. Por ejemplo, las proteínas pueden dirigirse hacia un tipo de células tumorales de interés mediante su conjugación con anticuerpos específicos frente a antígenos expresados en la superficie celular de las células de elección o su unión a ligandos de receptores expresados en la superficie celular de las células de elección. Varios anticuerpos útiles para el direccionamiento de agentes anti-cancerígenos a sus células diana son conocidos en el estado de la técnica.

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína recombinante de la invención, junto con cantidades suficientes de excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización particular, los excipientes farmacéuticamente aceptables son apropiados para la terapia anticancerígena sin inducir toxicidad, irritación, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica o similar.

Preferentemente, las composiciones de la invención se administrarán a los pacientes por vía intravenosa. Como podrán apreciar los expertos en la materia, las composiciones pueden prepararse en diferentes formas adecuadas para administrar por vía intravenosa.

La proteína recombinante de la invención también puede administrarse por vía tópica o por vía oral. Cuando la proteína de la invención se administra por vía oral preferentemente comprende un recubrimiento que evite su degradación en el tracto gastrointestinal.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender, adicionalmente, componentes que permitan una liberación controlada o mayor confort.

En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente que sufre de una enfermedad en una cantidad terapéuticamente efectiva, que se define como una cantidad suficiente para producir beneficios al paciente. La cantidad de proteína recombinante de la invención a administrar puede ser determinada por una persona experta en la materia siguiendo protocolos estándar en el campo de la clínica médica. La cantidad exacta

dependerá de la severidad de la enfermedad y del estado general de salud del paciente. Pueden administrarse dosis únicas o múltiples (a intervalos de tiempo) de las composiciones dependiendo de la dosis requerida. Por ejemplo, para administración intravenosa de ONC se usan cantidades entre 300 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{peso}$ y 1000 $\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{peso}$

5 La cantidad terapéuticamente efectiva también depende de si la proteína recombinante de la invención se usa como único agente antitumoral o se usa en combinación con otro agente antitumoral. Las terapias combinatorias son habituales en el campo del tratamiento del cáncer. Por tanto, en una realización particular, la RNasa según la invención se usa en combinación con otro agente anti-tumoral. Los agentes antitumorales de la presente invención se pueden usar en combinación con otros agentes antitumorales tales como tamoxifen, lovastatin, cis-platino, vincristina, inhibidores del proteasoma, interferones, doxorubicina y rosiglitazona, entre otros.

10 EJEMPLOS

1. METODOLOGÍA

1.1. Construcción de variantes de la ribonucleasa pancreática humana (RNasa-PH).

Las variantes de RNasa-PH descritas y los oligonucleótidos usados para su construcción están enumerados en el listado de secuencias.

15 1.1.1. Construcción de pM5SLN.

Se introdujo la secuencia SEC ID NO: 2 en el extremo C-terminal de la variante de la RNasa-PH PM5cct contenida en el vector pM5cct (la construcción pM5cct se obtuvo a partir de pM5 mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótido, utilizando los oligonucleótidos T7PROM (SEC ID NO: 35) y M9CCT1 (SEC ID NO: 36). Para la construcción, el gen de PM5 fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos T7PROM y M9CCT1 y el DNA resultante fue posteriormente digerido con los enzimas de restricción NdeI y Sall. El producto de la digestión se insertó en el fragmento del plásmido pM5 resultado de eliminar el gen de la RNasa mediante la digestión con los enzimas de restricción NdeI y Sall. (Bosch et al, supra; Canals A., Ribo M., Benito A., Bosch M., Mombelli E., Vilanova M. "Production of Engineered Human Pancreatic Ribonucleases, Solving Expression and Purification Problems, and Enhancing Thermostability". Protein Expression and Purification 1999, vol. 17, p. 169–181). Para ello, los oligonucleótidos complementarios CTSLN_1 (SEC ID NO: 17) y CTSLN_2 (SEC ID NO: 18) se mezclaron a concentraciones equimolares, se calentaron hasta 90°C, y la temperatura se dejó descender gradualmente hasta 25°C durante 30 min. Los oligonucleótidos aparejados fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa y ligados al vector pM5cct previamente digerido con BamHI y HindIII. Con el DNA resultante se transformaron células DH5 α para obtener pM5SLN.

30 Construcción de pSLNPM5

Esta variante fue construida en dos pasos. Primero se construyó la variante pLINKM5. Para ello, el gen de la variante de la RNasa-PH contenido en el plásmido pM5 (Canals *et al*, supra) fue amplificado usando los oligonucleótidos T7TERM (SEC ID NO: 19) y PLINKME_1 (SEC ID NO: 20), el cual introduce una diana de restricción HindIII en el extremo 5' del gen. El producto de PCR fue digerido con HindIII y Sall, y ligado al vector pET17b (Novagen (Madison, WI)) previamente digerido con HindIII y XhoI. Con el producto de la reacción de ligamiento se transformó la línea DH5 α (Invitrogen) para obtener el vector pLINKM5. La secuencia que codifica para SEC ID NO: 2 se introdujo en el extremo 5' del gen que codifica para la HP-RNasa del vector pLINKM5 para crear pSLNPM5. Para ello, los oligonucleótidos complementarios NTSLN_1 (SEC ID NO: 21) y NTSLN_2 (SEC ID NO: 22) se mezclaron a concentraciones equimolares, se calentaron hasta 90°C, y la temperatura se dejó descender gradualmente hasta 25°C durante 30 min.

Los oligonucleótidos aparejados fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa y ligados a pLINKM5, previamente digerido con HindIII y NdeI. Con el DNA resultante se transformaron células DH5 α para obtener pSLNPM5.

45 1.1.2. Construcción de pM5SLN(β 4- β 5).

Para la construcción de esta variante se partió del vector pM5 (Bosch *et al*, 2004) y mediante mutagénesis dirigida utilizando el kit "Quik-change PCR site-directed mutagénesis" (Stratagene, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los oligonucleótidos, BM1 (SEC ID NO: 23) y BM2 (SEC ID NO: 24), se introdujeron las dianas de restricción BamHI y MunI que sustituían la secuencia 86-93 de la variante PM5 de la RNasa-PH. Los productos de PCR fueron digeridos con DpnI y se utilizaron para transformar células DH5 α para obtener pM5int.

50 La secuencia que codifica para la SEC ID NO: 2 se introdujo en el lazo β 4- β 5 de la proteína codificada por el gen de la variante PM5 de la RNasa-PH para crear pPM5SLN(β 4- β 5). Para ello, los oligonucleótidos complementarios INTSLN_1 (SEC ID NO: 25) y INTSLN_2 (SEC ID NO: 26) se mezclaron a concentraciones equimolares, se calentaron hasta 90°C, y la temperatura se dejó descender gradualmente hasta 25°C durante 30 min. Los

oligonucleótidos aparejados fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa y ligados a pM5int, previamente digerido con BamHI y MunI. Con el DNA resultante se transformaron células DH5 α para obtener p5SLN(β 4- β 5).

1.1.3. Construcción de pSLNPE5 y pE5SLN.

5 pSLNPE5 y pE5SLN se obtuvieron a partir de pSLNPM5 y pM5SLN introduciendo los cambios Gly89Arg y Ser90Arg. Estos cambios fueron introducidos mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótido utilizando el kit "Quik-change PCR site-directed mutagénesis" (Stratagene, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados para la construcción de estas variantes fueron: PE5A (SEQ ID NO: 27) y PE5B (SEQ ID NO: 28). Los productos de PCR fueron digeridos con DpnI y se utilizaron para transformar células DH5 α para obtener pSLNPE5 y pE5SLN.

1.1.4. Construcción de pE10.

15 PE10 es la variante definida por la SEC ID NO: 1 donde X₉ es Gln, X₁₆ es Asp, y X₁₇ es Ser. Esta variante fue construida en dos pasos. Primero se construyó la variante PE9 (SEQ ID NO: 12) introduciendo los cambios Gly89Arg y Ser90Arg sobre la secuencia de la RNasa-PH salvaje. Para ello, el vector pE5 obtenido según Bosch *et al* (supra) fue digerido con los enzimas de restricción SacI y Sall y un fragmento de 320 pares de bases (que corresponde al segmento del gen comprendido entre los codones 21 a 128) se ligó al vector pM9 (vector que contiene el gen salvaje que codifica para la RNasa-PH) previamente digerido con los mismos enzimas de restricción SacI-Sall y se transformaron células DH5 α para obtener pE9. pE10 se obtuvo a partir de pE9 introduciendo los cambios Arg4Ala y Lys6Ala. Estos cambios fueron introducidos mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótido utilizando el kit "Quik-change PCR site-directed mutagénesis" de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados para la construcción de esta variante fueron R4AK6A3 (SEQ ID NO: 29) y R4AK6A5 (SEQ ID NO: 30).

Los productos de PCR fueron digeridos con DpnI y se utilizaron para transformar células DH5 α para obtener pE10.

1.1.5. Construcción de pSLNPE10.

25 Esta variante se construye en dos etapas. En una primera etapa se introduce en el vector pSLNPE5 la mutación Glu9Gln (dando lugar al vector pSLNPE5Glu9Gln) mediante mutagénesis dirigida utilizando el kit "Quik-change PCR site-directed mutagénesis" de Stratagene, USA, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los oligonucleótidos E9Q_1 (SEQ ID NO: 31) i E9Q_2 (SEQ ID NO: 32).

30 En una segunda etapa, se introduce en la variante SLNPE5Glu9Gln la mutación Gly16Asp y Asn17Ser (dando lugar al vector pSLNPE10) mediante el mismo procedimiento de mutagénesis dirigida descrito anteriormente (Quikchange de Stratagene) y los oligonucleótidos D16S17_1 (SEQ ID NO: 33) i D16S17_2 (SEQ ID NO: 34).

Los productos de PCR se digieren con DpnI y se utilizan para transformar células DH5 α para obtener pSLNPE10.

1.2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes derivadas de la RNasa-PH.

35 Se inocularon cultivos de noche de células BL21(DE3), que habían sido transformadas con el vector derivado de pET17 que contenía la variante deseada, a una dilución 1:100 en 5 erlenmeyers de 2L cada uno, que contenían 400 mL del medio de cultivo Terrific Broth (Sambrook et al "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (tercera edición) CSHL Press) (suplementado con 50 μ g/ml de ampicilina. Se permitió su crecimiento a 37°C con agitación vigorosa. La expresión proteica fue inducida en la fase exponencial tardía mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. Después de 3-4 h más de crecimiento, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 7500xg durante 7 min y los sedimentos fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

40 Los sedimentos congelados se descongelaron y fueron resuspendidos en 30 mL de 50 mM Tris-acetato pH 8,0, 10 mM EDTA, las células fueron lisadas mediante una prensa de French y centrifugadas a 9400 xg durante 45 min para aislar los cuerpos de inclusión. Los agregados proteicos fueron disueltos en 10 mL de 6 M cloruro de guanidinio, 100 mM Tris-acetato, 2 mM EDTA, pH 8,0, y reducidos mediante la adición de GSH a una concentración final de 0,1 M. El pH se ajustó a 8,5 mediante la adición de Tris sólido y la muestra fue incubada a temperatura ambiente, bajo atmósfera de nitrógeno, durante 2h. Después de la eliminación del material insoluble mediante centrifugación a 1400 xg durante 30 min, la proteína soluble se diluyó en 2 L de 0,1 M Tris-acetato, 0,5 M L-arginina, 1 mM GSSG, 2 mM EDTA, pH 8,5, y fue incubada a 10°C durante al menos 48 h. La muestra se ajustó a pH 5,0 con ácido acético glacial y fue concentrada hasta 150 mL mediante ultrafiltración tangencial. La muestra concentrada fue dializada exhaustivamente frente a 50 mM acetato sódico, pH 5,0. El material precipitado o insoluble se descartó mediante centrifugación a 15300xg durante 30min.

Las proteínas recombinantes replegadas fueron purificadas mediante cromatografía de intercambio catiónico en una columna Mono-S HR 5/5 FPLC, equilibrada con 50mM acetato sódico a pH 5,0 y eluidas con un gradiente lineal de 0

a 1M de NaCl. Las proteínas recombinantes eluyeron a las siguientes concentraciones de NaCl: 550 mM (PE5), 540 mM (PE10) y 620mM (SLNPE5), 600 mM (PE5SLN), 510 mM (SLNPM5), 500 mM (PM5SLN) y 310 mM (PM5SLN(β 4 β 5)), en este último caso la cromatografía se llevó a cabo a pH 8,0 y en los anteriores casos a pH 5,0. Las fracciones que contenían las proteínas recombinantes puras y homogéneas fueron dializadas frente a agua ultra pura y liofilizadas para ser almacenadas a -80°C hasta posteriores análisis. La masa molecular de cada variante se confirmó mediante espectrometría de masas, MALDI-TOF.

1.3. Ensayos de citotoxicidad.

Células NCI/ADR-RES (procedentes del laboratorio del Dr. K. Cowan del National Cancer Institute, NCI, Bethesda, MD, USA), NCI-H460/R (procedentes del laboratorio del Dr. S. Ruzdijic del Institute for Biological Research" S. Stankovic, Belgrado, Serbia), HeLa, MCF7, A431 (estas tres líneas celulares fueron adquiridas a Eucellbank, Universidad de Barcelona, España), MCF10A (procedentes del laboratorio del Dr. J. Menéndez del Instituto de Investigación Biomédica de Girona), OVCAR-8 (adquiridas al National Cancer Institute, USA) y Jurkat (procedentes del laboratorio del Dr. B. Beaumelle del CNRS de Montpellier) fueron colocadas en placas de 96 pocillos a una densidad apropiada, es decir, 10000 células por pocillo para la línea celular NCI/ADR-RES, 3000 células por pocillo para la línea celular NCI-H460/R, 1100 células por pocillo para la línea celular HeLa, 7000 células por pocillo para la línea celular MCF7, 2500 células por pocillo para la línea celular A431, 2500 células por pocillo para la línea celular MCF10A, 1500 células por pocillo para la línea celular OVCAR-8 y 6000 células por pocillo para la línea celular Jurkat. Después de 24h de incubación, las células fueron tratadas con varias concentraciones de PE5 (0,1–30 μ M), PE10 (0,1–30 μ M), SLNPE5 (0,001–10 μ M), PE5SLN (0,1–30 μ M), SLNPM5 (0,1–30 μ M), PM5SLN (0,1–30 μ M), PM5SLN(β 4– β 5) (0,1–30 μ M) u ONC (0,001–10 μ M) durante 72 h. La sensibilidad a las diferentes proteínas se determinó mediante el método del MTT esencialmente tal como describe el fabricante (Sigma, USA). Se recogieron los datos mediante lecturas de absorbancia a 570nm con un equipo de multilectura de placas (BioTek Instruments, USA). Los valores de IC₅₀ representan la concentración de la RNasa ensayada que se requiere para inhibir la proliferación celular en un 50% y fueron calculados para algunas variantes mediante interpolación lineal a partir de las curvas de crecimiento obtenidas.

1.4. Ensayo de inhibición de las proteínas recombinantes

Se comprobó la actividad ribonucleolítica de las proteínas recombinantes en presencia de IR utilizando un ensayo en gel de agarosa, descrito en Bosch *et al*, 2004 (supra). Brevemente, 15 ng de cada proteína recombinante en 20 μ l de 20mM Hepes, 125 mM NaCl, 2,5 mM DTT, 10 mM EDTA, pH 7,0, se incubaron durante 10 min a 25°C con 0 o 40 unidades de IR (Promega, USA) (1 unidad es la cantidad de IR requerida para inhibir la actividad de 5 ng de RNasa en un 50%). Seguidamente se añadieron 4 μ g de 16S y 23S rRNA (Roche, Suiza) y las muestras fueron incubadas durante 10 min más a 25°C. Las reacciones se pararon mediante la adición de 3 μ l de tampón electroforético de carga (40% (p/v) sacarosa, 0,2% (v/v) pirocarbonato de dietilo, y 0,25% (p/v) de azul de bromofenol) y las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa (1,2% (p/v)) conteniendo bromuro de etidio.

1.5. Ensayo de degradación de RNA por las proteínas recombinantes (extracción de RNA nuclear y citoplasmático).

Se colocaron 3 *10⁶ células HeLa en un frasco de cultivo T75 (Nunc). Después de 4h de incubación las células se trataron con 0,1 μ M ONC, 0,3 μ M SLNPE5. Estas concentraciones corresponden a valores cercanos a los valores de IC₁₀ según el ensayo con MTT. Después de 24h de incubación, las células fueron recogidas mediante centrifugación a 400xg durante 5min a 4°C y lavadas con PBS enfriado en hielo. La fracción de RNA nuclear y citoplasmático se extrajo utilizando el kit PARIS k (Applied Biosystems/Ambion, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y almacenado a -80°C. Se cargaron muestras de 1 μ g de RNA en un gel de agarosa 1,5% en condiciones desnaturizantes y el grado de degradación del RNA fue medido por comparación con el RNA purificado de células HeLa no tratadas.

2. RESULTADOS

2.1. Citotoxicidad

PM5 es una variante de la RNasa-PH que presentan los cambios Arg4Ala, Lys6Ala, Gln9Glu, Asp16Gly y Ser17Asn. PM5SLN, SLNPM5 y PM5SLN(β 4– β 5) son variantes de PM5 que presentan la NLS definida por la SEC ID NO: 2 en su extremo C-terminal (PM5SLN), N-terminal (SLNPM5) o en el lazo β 4– β 5 (PM5SLN(β 4– β 5)). Estas variantes fueron producidas y purificadas, observándose al finalizar la producción que las proteínas estaban correctamente plegadas y activas. A continuación, se estudió su citotoxicidad en diferentes líneas celulares tumorales según se detalla en el apartado 1.3.

Las figuras FIG. 1 y FIG. 2 muestran los resultados de citotoxicidad de 3 producciones independientes de la variante PM5SLN β 4– β 5 (producciones 1-3). En cada gráfica se indica el porcentaje de células vivas (viabilidad) respecto a la concentración de proteína ensayada (curva dosis-respuesta). Cada uno de los trazos corresponde a un ensayo de

citotoxicidad diferente frente a una línea celular. Tal y como se puede observar en las figuras, la citotoxicidad fue en todos los casos idéntica a la del control sin proteína, es decir nula. El mismo resultado negativo se obtuvo al ensayar la citotoxicidad de las variantes PM5SLN y SLNPM5, las cuales contienen una SLN en el extremo C-terminal y N-terminal, respectivamente (resultados no mostrados). Todos estos datos indican que, independientemente de dónde se hubiera introducido la SLN, la variante derivada de PM5 no mostró actividad citotóxica alguna.

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo también con las proteínas recombinantes PE10, PE5, SLNPE5 y PE5SLN, utilizando ONC como control positivo. A partir de los resultados obtenidos en los ensayos se calculó el valor IC₅₀ para cada una de estas proteínas recombinantes y la ONC tal y como se explica en el apartado 1.3. Los resultados se expresan en la tabla 1.

Tabla 1. Valores medios de IC₅₀ en µM de las diferentes proteínas recombinantes y ONC sobre diferentes líneas tumorales.

	ONC IC ₅₀ media ± SD (µM)	SLNPE5 IC ₅₀ media ± SD (µM)	PE5 IC ₅₀ media ± SD (µM)	PE10 IC ₅₀ media ± SD (µM)	PE5SLN C50 media + SD (µM)
NCI/ADR-RES	1,18 ± 0,17	0,97 ± 0,05	8,91 ± 1,31	8,89 ± 1,57	5.40 + 0.49
NCI-H460/R	0,44 ± 0,12	0,40 ± 0,01	2,98 ± 0,39	3,28 ± 0,47	n.e
HeLa	0,15 ± 0, 01	0,27 ± 0,04	1,74 ± 0,27	1,88 ± 0,44	n.e
OVCAR8	0,54 ± 0,08	0,24 ± 0,04	3,32 ± 0,59	3,65 ± 0,80	n.e
Jurkat	0,33 ± 0,01	1,92 ± 0,17	13,12 ± 1,23	13,23 ± 0,85	n.e

n.e. no ensayado

Estos resultados indican que tanto PE5 como PE10 muestran cierta citotoxicidad frente a las líneas tumorales ensayadas. Sin embargo, su actividad citotóxica es muy inferior a la de la ONC. La inserción de un SLN en el extremo C-terminal de estas variantes da lugar a una proteína recombinante con una citotoxicidad algo superior, pero que todavía se encuentra muy por debajo de la actividad de la ONC. Sorprendentemente, la inserción del SLN en el extremo N-terminal de la variante PE5 resulta en una proteína recombinante cuya actividad citotóxica es de igual magnitud que la ONC.

2.2. Inhibición de las proteínas recombinantes por el IR.

La FIG. 3 representa la inhibición de las proteínas recombinantes y ONC a causa del IR citoplasmático. El ensayo se llevó a cabo incubando las proteínas recombinantes que se indican, con o sin IR, en presencia del sustrato (rRNA). Si la proteína recombinante escapa al IR como es el caso de la ONC (control positivo), el sustrato se degrada tanto en ausencia como en presencia del inhibidor. PE5, PE10 y SLNPE5, no degradan el sustrato en presencia del inhibidor, lo que indica que estas proteínas son sensibles al IR.

De estos resultados se deduce que la actividad citotóxica de las variantes es independiente del IR.

2.3. Degradación de RNA nuclear y citoplasmático por las proteínas recombinantes.

La FIG. 4 muestra los resultados de los ensayos de degradación de RNA nuclear a causa de la acción de las proteínas recombinantes realizada tal y como se indica en el apartado 1.5. Como se puede observar en la figura, SLNPE5 degrada RNA nuclear, mientras que deja intacto el RNA citoplasmático (resultados no mostrados). En cambio, la ONC no degrada el RNA nuclear.

Del conjunto de los resultados de las figuras 4 y 5 se deduce que la actividad citotóxica de las variantes PE5, PE10 y SLNPE5, al contrario que la de la ONC, es consecuencia de su eficiente importación al núcleo y no de su capacidad para escapar al IR. Dado que no existe diferencia alguna entre la sensibilidad al IR entre estas tres variantes, la elevada citotoxicidad que presenta SLNPE5 frente a PE5 y PE10 ha de ser consecuencia de una importación más eficiente al núcleo.

REIVINDICACIONES

1. Proteína recombinante con actividad ribonucleasa que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 1 fusionada a través de su extremo N-terminal con una secuencia de localización nuclear, siendo la SEC ID NO: 1
- 5 KESAAAKFXRQHMDSXSPSSSTYCNQMMRRRNMTQGRCKPVNTFVHEPLVDVQNVCFQEKVTKNGQGNCYK
SNSSMHITDCRLTNRRRYPNCAYRTSPKERHIIIVACEGSPYVPVHFASVEDST, donde
- X₉ es ácido glutámico (E) o glutamina (Q),
X₁₆ es glicina (G) o ácido aspártico (D), y
X₁₇ es asparagina (N) o serina (S).
- 10 2. Proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, donde la secuencia de localización nuclear se selecciona del grupo que consiste en las secuencias SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4.
3. Proteína recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde
- X₉ es ácido glutámico (E),
X₁₆ es glicina (G), y
X₁₇ es asparagina (N).
- 15 4. Proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, que consiste en la secuencia SEC ID NO: 10.
5. Proteína recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde
- X₉ es glutamina (Q),
X₁₆ es ácido aspártico (D), y
X₁₇ es serina (S).
- 20 6. Proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, que consiste en la secuencia SEC ID NO: 14.
7. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína recombinante como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, junto con cantidades suficientes de excipientes farmacéuticamente aceptables.
8. Proteína recombinante según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para uso como medicamento.
- 25 9. Proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 8, para uso como agente antitumoral.
10. Proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 9, para uso en el tratamiento de cáncer con fenotipo de multiresistencia a medicamentos.
11. Proteína recombinante de acuerdo con las reivindicaciones 9-10, para uso en el tratamiento del cáncer de ovario, pulmón y mama.
- 30 12. Proteína recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9-11, para uso en combinación con otro agente antitumoral.
13. Uso de la proteína recombinante como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- 35 14. Procedimiento para la construcción de una proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:
- a) introducir la secuencia del gen que codifica para la RNasa-PH (gene ID: 6035, fecha de actualización 13 de enero del 2011) en un vector de expresión, donde dicho vector contiene los elementos necesarios para llevar a cabo la expresión del gen contenido en dicho vector;
- 40 b) incorporar en el vector resultante del paso (a) una cadena de nucleótidos que codifica para una secuencia de localización nuclear en el extremo del gen que codifica para la región N-terminal de la RNasa-PH, donde dicha incorporación se lleva a cabo mediante técnicas de mutagénesis en cassette;

- c) inducir modificaciones en el vector resultante del paso (b) de modo que se obtiene un nuevo vector que comprende la secuencia que codifica para la proteína recombinante definida de acuerdo con la reivindicación 1, donde dichas modificaciones se llevan a cabo mediante mutagénesis dirigida por oligonucleótido; y
- 5 d) llevar a cabo la expresión de la secuencia que codifica para la proteína recombinante definida en la reivindicación 1 a partir del vector resultante del paso (c).
15. Molécula de ADN aislada que codifica para la proteína recombinante como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
16. Molécula de ADN aislada de acuerdo con la reivindicación 15 que codifica para la proteína recombinante seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 10 y SEC ID NO: 14.
- 10 17. Molécula de ADN aislada de acuerdo con la reivindicación 16 que consiste en SEC ID NO 15 y la SEC ID NO: 16
18. Vector de expresión que comprende una molécula de ADN como se define en cualquiera de las reivindicaciones 15-17.
19. Célula hospedadora que comprende el vector de expresión definido en la reivindicación 18.

FIG. 1

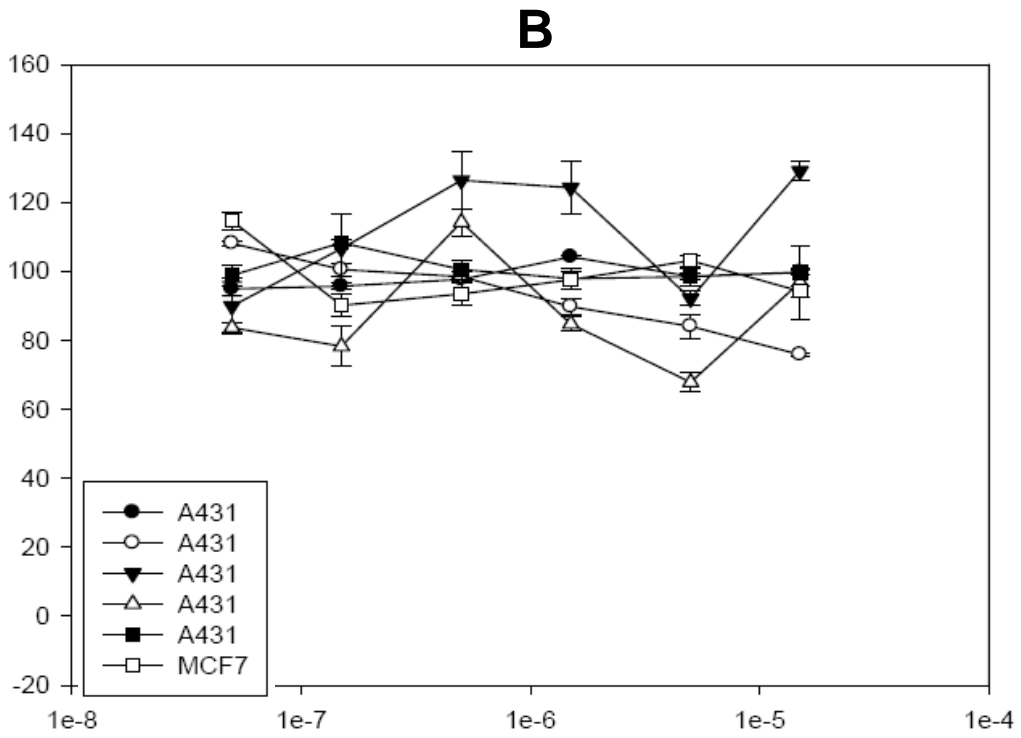
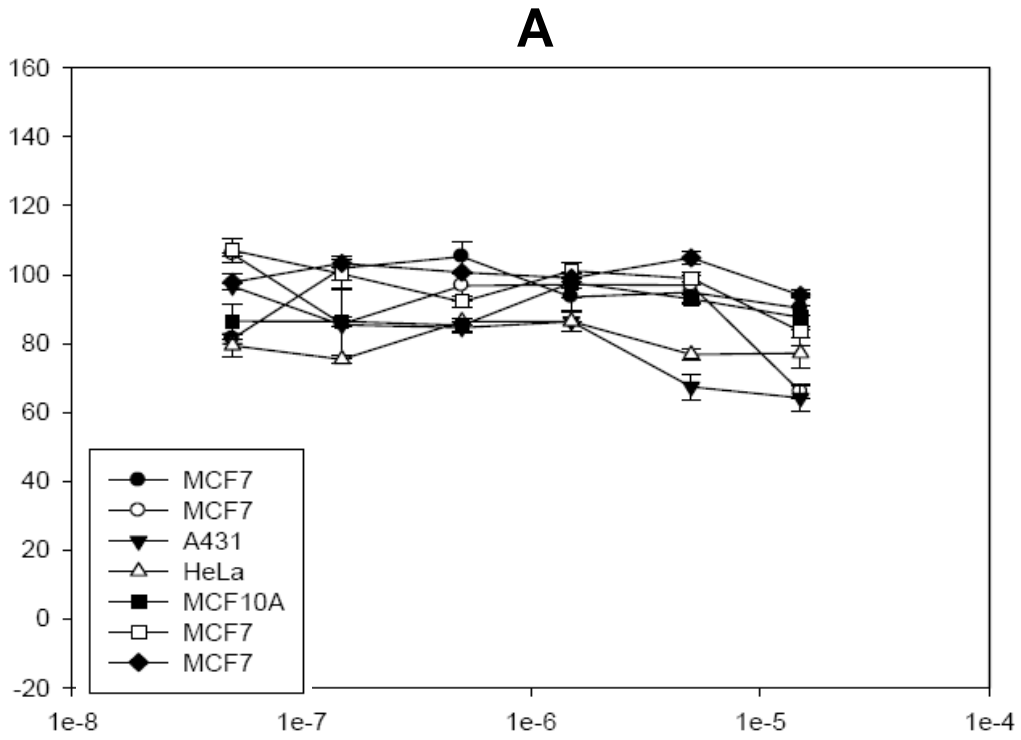


FIG. 2

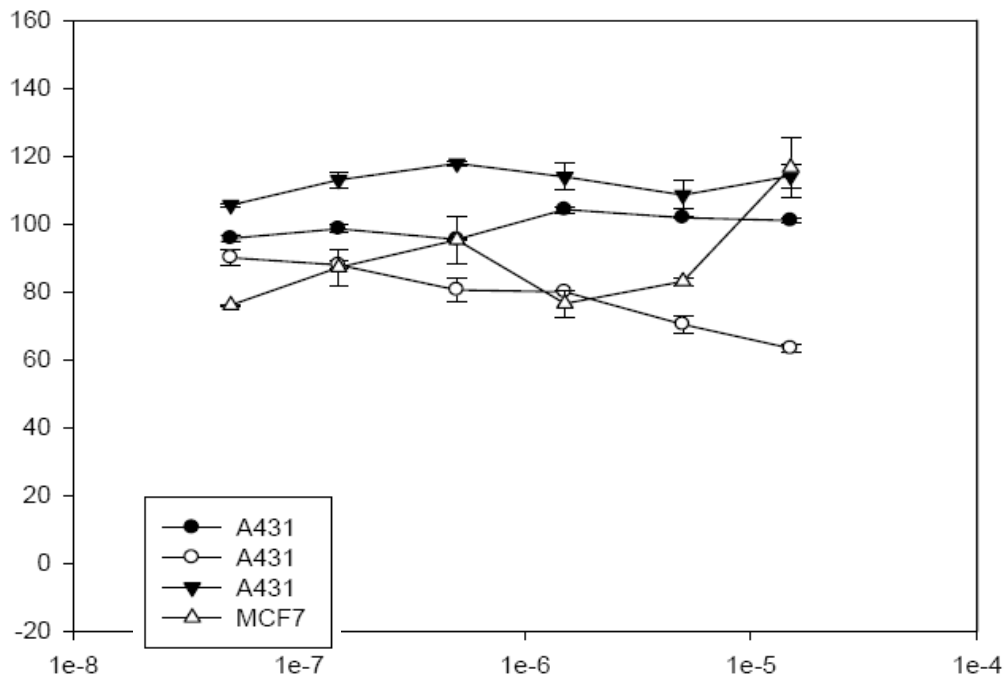


FIG. 3

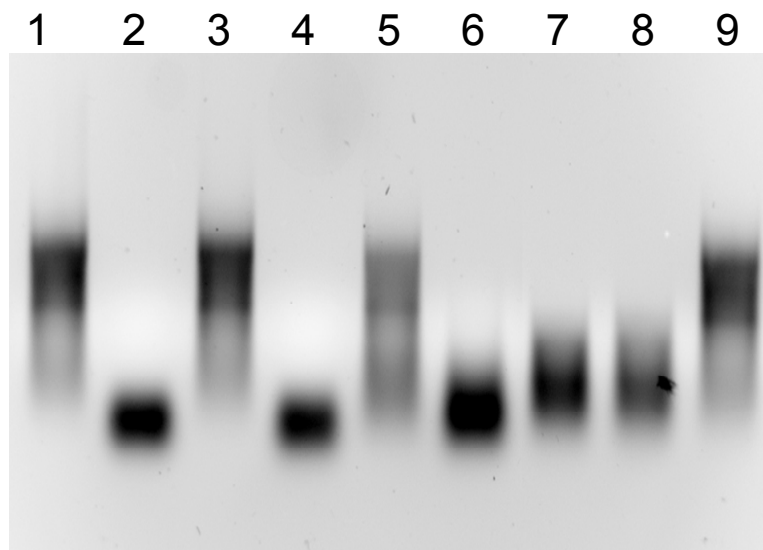
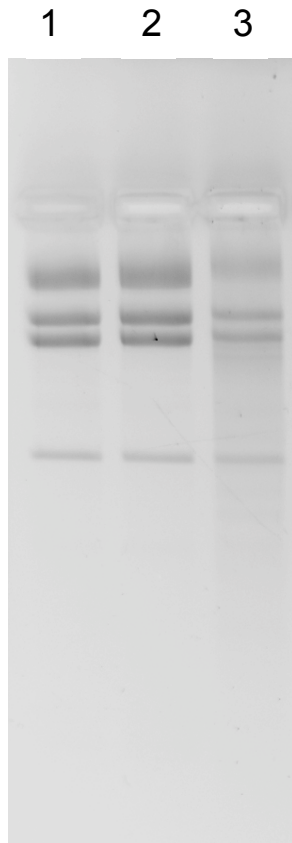


FIG. 4





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130324

②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.03.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N9/22** (2006.01)
A61K38/46 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X A	VILANOVA M. et al. Ribonucleases directed to the nucleus as a novel proapoptotic anticancer strategy. <i>New Biotechnology</i> . Sep. 2009. Vol. 25. N.º. Suppl. 1. Páginas S8-S9. ISSN 1871-6784.	1-3,5,6 4-7-19
X A	RODRIGUEZ M. et al. A Cytotoxic Ribonuclease Variant with a Discontinuous Nuclear Localization Signal Constituted by Basic Residues Scattered Over Three Areas of the Molecule. <i>Journal of Molecular Biology</i> . 14.07.2006. Vol. 360. N.º. 3. Páginas 548-557. ISSN 0022-2836.	1-3,5,6 4,7-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
08.08.2012

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, SEARCH-SEQUENCES (EBI-SITE)

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.08.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-19	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 4, 7-19	SI
	Reivindicaciones 1-3, 5, 6	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	VILANOVA M. et al. Ribonucleases directed to the nucleus as a novel proapoptotic anticancer strategy. <i>New Biotechnology</i> . Sep. 2009. Vol. 25. Nº. Suppl. 1. Páginas S8-S9. ISSN 1871-6784.	
D02	RODRIGUEZ M. et al. A Cytotoxic Ribonuclease Variant with a Discontinuous Nuclear Localization Signal Constituted by Basic Residues Scattered Over Three Areas of the Molecule. <i>Journal of Molecular Biology</i> . 14.07.2006. Vol. 360. Nº. 3. Páginas 548-557. ISSN 0022-2836.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un grupo de proteínas de fusión recombinantes producidas por inserción de una secuencia de localización nuclear (SLN) en el extremo N-terminal de una secuencia proteica con actividad ribonucleasa.

Las reivindicaciones 1-12 hacen referencia a las proteínas recombinantes, la reivindicación 14 se refiere a su uso, la reivindicación 14 la procedimiento de construcción de la proteína recombinante, las reivindicaciones 15-17 a las moléculas de ADN que codifican las proteínas recombinantes, y las reivindicaciones 18 y 19 a un vector de expresión y una célula hospedadora que comprenda alguna de las moléculas de ADN reivindicadas.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga proteínas de fusión SLN-RNasa idénticas a las divulgadas en la presente solicitud, por lo que las reivindicaciones 1-19 serían nuevas según se menciona en el art. 6 de la Ley 11/1986.

D01 representa el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la solicitud divulga la construcción de una variante de la ribonucleasa pancreática humana (HP-RNase), denominada PE5, que presenta una SLN que es responsable de su transporte al núcleo, lo que supuso un aumento de su capacidad citotóxica. Su citotoxicidad se probó en células de líneas de ovario. La diferencia entre el documento anterior y la presente solicitud es la inserción de la SLN en el extremo N-terminal de la ribonucleasa. El efecto técnico de esa diferencia sería el mayor orden de magnitud de la actividad citotóxica de la ribonucleasa a la cual se ha fusionado la SLN seleccionada. El problema planteado por el objeto de la invención contenido en las reivindicaciones sería la provisión de proteínas recombinantes de fusión SLN-actividad ribonucleasa con elevada actividad citotóxica.

Según se deriva de los datos aportados en la memoria descriptiva (tabla 1) únicamente se observa ese efecto sorprendente en la variante denominada SLNP5 (SEC .ID. NO: 10, SEC. ID. NO: 15), por lo que sólo las reivindicaciones 4, 7-19, en la medida que hagan referencia a la secuencia proteica y nucleica de la proteína identifica por la SEC. ID. NQ: 10, cumpliría con el requisito de actividad inventiva, tal y como se menciona en el art. 8 de la Ley 11/1986. Para las demás variantes que aparecen en las reivindicaciones tal diferencia no implica ese efecto sorprendente o inesperado, ya que en ninguna parte de la descripción se muestra evidencia alguna. Así las reivindicaciones 1-3, 5, 6 no pueden considerarse inventivas tal y como se menciona en el art. 8 de la Ley 11/1986, puesto que no resuelven el problema planteado.