

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 126**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**C07K 14/265** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05762122 .9**  
96 Fecha de presentación: **05.07.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1787653**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.05.2007**

54 Título: **Composición farmacéutica antitumoral que contiene fragmentos polipeptídicos de serralisinas**

30 Prioridad:  
**08.07.2004 CU 14704**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.10.2012**

73 Titular/es:  
**CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (CIGB) (100.0%)**  
**AVENIDA 31 ENTRE 158 Y 190, CUBANACAN PLAYA**  
**CIUDAD DE LA HABANA 10600, CU**

72 Inventor/es:  
**ABRAHANTES PEREZ, MARÍA DEL CARMEN;**  
**REYES GONZÁLEZ, JESÚS;**  
**VELIZ RÍOS, GLORIA;**  
**MARTÍNEZ DÍAZ, EDUARDO;**  
**GASMURI GONZÁLEZ, CARIDAD ANAIS;**  
**GARCÍA SUÁREZ, JOSÉ;**  
**BEQUET ROMERO, MÓNICA;**  
**GONZÁLEZ LÓPEZ, LUIS JAVIER;**  
**CASTELLANOS SERRA, LILA ROSA;**  
**SELMAN-HOUSEIN SOSA, MANUEL;**  
**GÓMEZ RIERA, RAÚL y**  
**GAVILONDO COWLEY, JORGE VICTOR**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

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).

ES 2 389 126 T3

## DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica antitumoral que contiene fragmentos polipeptídicos de serralisinas

Campo de la invención

5 La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología, la industria farmacéutica y, en concreto, con la producción de una composición capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales. Esta composición contiene fragmentos polipeptídicos de serralisinas, obtenidos de la degradación de la proteína intacta, que tienen una actividad antiproliferativa mayor que la de las moléculas enteras de serralisina. Dichos fragmentos pertenecen al extremo C de las serralisinas, desde la metionina interna de la secuencia de la serralisina al final de la molécula, y la combinación de los mismos con prodigiosinas que potencial el efecto antitumoral de esta composición.

10 **Técnica anterior**

Tradicionalmente, la quimioterapia para el cáncer se ha dirigido a la inhibición de la proliferación de las células cancerosas. No obstante, en los últimos años, el interés de los productos antitumorales que inducen la apoptosis ha aumentado porque el cáncer se ha establecido como patología relacionada con una deficiencia relativa en la apoptosis, en lugar de un exceso de la proliferación.

15 Las bacterias o sus extractos se han usado para el tratamiento del cáncer durante casi 100 años. El informe más citado procede del médico y cirujano William B. Coley del Memorial Hospital in New York city, el Sloan-Kettering Memorial Hospital. Ha observado que muchos de estos pacientes con varios tipos de cáncer experimentan regresión tumoral tras ser infectados con bacterias patogénicas. (Coley, W. B. 1991-reimpreso de 1893-. Clin. Orthop. 262:3).

20 La resistencia a los tumores en pacientes o animales infectados se atribuyó a la inmunidad antitumoral celular concomitante (Paglia, P. y Guzmán, C. A. 1998. Cáncer inmunol. Immunother. 46:88). Recientemente, Hunter y col. ha cuestionado la idea de que la infección por bacterias patogénicas o protozoos podría activar la regresión del cáncer mediante la activación de la inmunidad innata o adaptativa. (Hunter, C. A., Yu, D., Gee, M., Ngo, C. V., Seignani, C., Goldschmidt, M., Golovkina, T. V., Evans, S., Lee, W. F. y Thomas-Tekhonenko, A. 2001. J. Immunol. 166:5878). Demostraron que los tejidos infectados por *T. Gondii* producen algunos factores antiangiogénicos solubles que evitan la formación de vasos sanguíneos en los tumores, lo que podría ser de potencial interés terapéutico. Este proceso de formación de nuevos capilares conocido como angiogénesis se ha convertido en un foco de atención importante para la implementación de nuevas terapias para el cáncer y sus metástasis. La búsqueda de factores antiangiogénicos es la base de nuevas estrategias terapéuticas anticancerosas (Folkman, J. 2003. Seminars in Cáncer Biology. 13:159). Recientemente, el uso de bacterias como agentes quimioterapéuticos y agentes antivascuales selectivos ha tenido como resultado una regresión significativa de tumores subcutáneos (sc) en ratones. Este tratamiento se denomina terapia bacteriolítica combinada (COBALTO) (Dang, L. H., Bettgowda, C., Huso, D.L., Kinzler, K.W. y Vogelstein, B. 2001. Proc Natl Acad Sci USA. 98: 15155). No obstante, las bacterias vivas producen una toxicidad importante y reacciones colaterales que limitan su uso contra el cáncer humano.

35 En los últimos años han aparecido algunos informes que indican que las bacterias anaerobias liberan proteínas redox que inducen la apoptosis de células tumorales ((Yamada, T., Goto, M., Punj, V., Zaborina, O. y Chen, M.L. 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 14088; Goto, M., Yamada, T., Kimbara, K., Horner, J., Newcomb, M., Gupta, T.K. and Chakrabarty, A. M. 2003. Mol Microbiol. 47:549). Se ha postulado que estas proteínas redox podrían estar incluidas en un grupo de proteínas solubles secretadas por los ancestros de las células procariotas y sus funciones podían haber sido la eliminación de células eucariotas ancestrales (Punj, V. y Chakrabarty, A. M. 2003. Cellular Microbiology. 5:225). En general se sabe poco sobre la producción de factores solubles secretados por estos organismos procariotas que podrían actuar de un modo específico sobre las células cancerosas, produciendo su muerte y, de forma concomitante, la regresión del tumor.

45 *Serratia marcescens* es una bacteria anaerobia facultativa. A partir de algunas de sus cepas se han obtenido algunas preparaciones con propiedades antitumorales, las más estudiadas son: [a] ImuVert® (Budagov, R.S. y Ulianova, L.P. 2001. Radiats Biol Radioecol Russian. 41:38), una preparación de membranas ribosomales que activan el sistema inmunitario del paciente; [b] la proteasa de *Serratia* Mr 56,000 (Wu, J., Akaike, T., Hayashida, K., Okamoto, T., Okuyama, A. and Maeda, H. 2001. Jpn. J. Cáncer Res. 92:439), que induce la muerte de las células por necrosis dependiendo de la expresión de la  $\alpha$ -2-macroglobulina; y [c] las prodigiosinas, una familia de pigmentos que actúan como inmunosupresores y anticancerígenos a través de la inducción de la apoptosis (Montaner, B y Pérez Tomas, R. 2003. Curr Cáncer Drug Targets. 3:57; Pérez Tomas, R. y Montaner, B. 2003. Histol Histopathol. 18:379).

Los autores han obtenido fragmentos no proteolíticos de las serralisinas con mayor actividad citotóxica que las moléculas enteras. Esto permite la combinación de estos fragmentos con dosis bajas de prodigiosina, disminuyendo la toxicidad indicada para el pigmento e incrementando el efecto antiproliferativo sobre las células tumorales.

**Descripción detallada de la invención**

Las composiciones de la presente invención son capaces de inhibir el crecimiento de células tumorales y están formadas por fragmentos polipeptídicos de las serralisinas, con un efecto antiproliferativo mayor que las moléculas de serralisinas enteras, que pueden combinarse con prodigiosinas que potencian su efecto antitumoral.

5 La presente invención describe la composición de la preparación MG2327, en la que coexisten los polipéptidos y las prodigiosinas, que tienen un amplio espectro de actividad citotóxica sobre las líneas celulares malignas, con un efecto selectivo sobre las células tumorales transformadas y, específicamente, sobre las células activadas para su crecimiento. El estudio de sensibilidad sobre diferentes líneas celulares, tumorales o no, demuestra que las líneas celulares normales son solo ligeramente sensibles a la preparación MG2327, mientras que las células derivadas de  
 10 melanoma, carcinoma laríngeo, fibrosarcoma, hepatocarcinoma y carcinoma uterino-cervical (positivos o no para el virus del papiloma humano) son muy sensibles. Los carcinomas de origen hematopoyético son menos sensibles. Las células HUVEC activadas para su crecimiento son más sensibles a la preparación MG2327 que las no activadas. La preparación MG2327 puede actuar específicamente sobre factores expresados o sobreexpresados durante el proceso de la división celular. Estos factores constituyen dianas terapéuticas contra el cáncer u otras enfermedades de origen proliferativo. Además, estos factores también constituyen dianas para el diagnóstico precoz de enfermedades originadas por un exceso de proliferación o por la proliferación no controlada de células diferenciadas o no diferenciadas. Las formulaciones de liberación controlada que contienen estas moléculas podrían dirigirse a estas dianas en proliferación que actúan de un modo específico sobre ellas; ya que las células normales son más resistentes a su acción.

20 Con el fin de demostrar la actividad antitumoral de la preparación MG2327, se expuso a ratones BALB/c a una inoculación intraperitoneal de células tumorales CB Hep.1 de origen mieloides capaces de producir tumores murinos ascíticos (Fontirrochi, G., Dueñas, M., Fernandez de Cossio, M.E., Fuentes, P., Pérez, M., Mainet, D., Ayala, M., Gavilondo, J.V. and Duarte, C.1993. *Biotechnol Aplic.* 10: 24-30). Tras 10 días se inyectó a los ratones por vía intraperitoneal la preparación MG2327 o PBS. El 60 % de los animales tratados con 1 mg/kg sobrevivió, mientras  
 25 que solo el 25 % de los controles estaba vivo 45 días después de comenzado el tratamiento (Fig. 8). La regresión tumoral total se observó en los supervivientes tratados, que mostraban un estado saludable, mientras que en los controles, los tumores progresaron hasta formar masas sólidas grandes y los ratones mostraron un deterioro del estado de salud general.

30 Los ratones BALB/c portadores de tumores de origen mieloides tratados con una dosis de 1 mg/kg de peso de la preparación MG2327 sobrevivieron con regresión total. Esta misma dosis aumenta la supervivencia con una reducción significativa del volumen tumoral en ratones BALB/c portadores de un tumor originado por fibroblastos transformados con E6/E7. MG2327 protegió a los ratones BALB/c del implante de tumores mieloides.

35 La preparación MG2327 se obtuvo como resultado de la optimización de las condiciones de cultivo para producir moléculas antiproliferativas. La preparación MG2327 se obtuvo como resultado de la optimización de las condiciones de cultivo para producir moléculas antiproliferativas que constituyen un agente protector contra el implante y el desarrollo de tumores malignos, de este modo, como inductor de la producción de moléculas antiproliferativas, apoptóticas y antiangiogénicas en células normales y tumorales, que podrían usarse de forma ventajosa en la profilaxis y en la terapia del cáncer, además de en otras enfermedades relacionadas con estos acontecimientos.

40 La cepa CMIB 4202 sobreexpresa proteínas solubles en el intervalo de 45-50 y 20-30 kDa (50 y 25 kDa determinado mediante SDS-PAGE, con un coeficiente de determinación de 0,984). La fracción de 25 KDa, denominada p25, mostró una potente actividad antiproliferativa dependiente de la dosis en el experimento realizado con la línea celular HEp-2 incubada con EDTA, mientras que la fracción de 50 KDa denominada p50, no inhibió el crecimiento. No obstante, la fracción p50 incubada con  $Zn_2SO_4$  5 mM mostró actividad antiproliferativa pero menos potente que la de la fracción p25. La  $CI_{50}$  de las fracciones p25 y p50 fueron 0,48 nM y 16 nM, respectivamente.

45 Las biomoléculas aisladas con efecto antiproliferativo (polipéptidos y prodigiosita) se realizaron en la presente invención mediante una etapa de cromatografía: Intercambio iónico usando un gradiente discontinuo de NaCl. Se usó una matriz de Sepharosa Fast Flow de DEAE o QAE, equilibrada con tampón fosfato 50 mM a pH 8,00. La elución se realizó con un gradiente discontinuo de NaCl: tampón fosfato 50 mM – NaCl 0,1M, pH 8,00; tampón fosfato 50 mM – NaCl 0,2M, pH 8,00; tampón fosfato 50 mM – NaCl 2M, pH 8,00 y, por último, la fracción de pigmento absorbida en la matriz se eluyó con etanol absoluto al 70 %. Los resultados confirman que la preparación con componente proteico de 25 kDa tienen una capacidad mayor que el componente proteico de 50 kDa de la misma preparación para inhibir el crecimiento de células tumorales y ambas presentan actividad biológica *in vitro* de forma independiente.

55 Los fragmentos de varios tamaños moleculares provocados por la degradación de p50 incluyeron fragmentos de 25 kDa. El incremento de la degradación de p50 se obtuvo con temperaturas altas y la generación de p25 fue

proporcional al incremento de temperatura. Los anticuerpos policlonales anti-p50, obtenidos en ovejas, reconocieron p25 en el ensayo de transferencia Western, por tanto, el p25 se originó como producto de la degradación de la proteína p50. La actividad antiproliferativa de los productos aumentó proporcionalmente al estado de degradación. Estos resultados confirman que la autólisis de p50 es capaz de producir fragmentos degradados con actividad antiproliferativa más potente que la molécula original (p50). Además, la proteína p25 también induce la regresión total de tumores malignos de origen mielóide. Los fragmentos de p50 pueden conjugarse genéticamente con fragmentos de anticuerpos mediante metodología conocida para generar inmunotoxinas, útiles para tratar enfermedades de etiología proliferativa. Asimismo, este fragmento, solo o combinado con otras moléculas proteicas, puede emplearse como vehículo. La actividad proteolítica de p50 se inhibió con EDTA 7 Mm, que demostró que p50 es una metaloproteasa que se identificó mediante espectrometría de masas y pertenece a la familia de las serralisinas. Las principales similitudes de estos fragmentos se encontraron con las especies identificadas como PRZN\_SERSP y PRZN\_SERMA en la base de datos de proteínas Swissprot. La proteína p25 purificada con cromatografía no tiene actividad enzimática y corresponde a la región carboxiterminal no catalítica de las serralisinas.

Los componentes proteicos y la prodigiosina se formularon en una misma composición que aumentó de manera significativa ( $p < 0.005$ ) el efecto inhibitorio con respecto a la forma independiente de su formulación. Esta composición se obtuvo manteniendo la misma relación de proteínas y prodigiosina que las empleadas cuando se evaluaron los componentes de forma independiente. En dicha composición, la prodigiosina puede encontrarse a una concentración de 0.1 - 100 nM, y los fragmentos de Serralisinas de entre 0.1 - 150  $\mu\text{g/ml}$ .

Como objeto de la presente invención se encuentra la obtención de composiciones para uso que contienen fragmentos polipeptídicos derivados de las Serralisinas, con mayores efectos anti-proliferativos que las moléculas de Serralisinas íntegras y las combinación de estos fragmentos con prodigiosinas, las cuales potencian de manera selectiva la actividad biológica de la composición.

Adicionalmente, estos fragmentos polipeptídicos tienen efecto apoptótico sobre las células cancerígenas. Este efecto apoptótico involucra a las mitocondrias, microtúbulos y fragmentación del ADN, amplificando la señal de muerte celular programada usando dosis bajas de estas composiciones. Estos acontecimientos también se observaron con composiciones combinadas de polipéptido y prodigiosina.

El efecto anti-angiogénico de MG2327 y los fragmentos polipeptídicos anti-proliferativos se evaluaron mediante el procedimiento de formación de estructuras tubulares en matrigel. Concentraciones no citotóxicas de MG2327 y sus fracciones p25 y p50 se incubaron con las células endoteliales humanas derivadas de microvasculatura (HMEC). Los resultados finales se evaluaron teniendo en cuenta la longitud de las estructuras tubulares formadas y el número de interconexiones entre ellas, usando el programa Image-Pro Express 4.5. La diferenciación o maduración de las células endoteliales se inhibió de manera significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA) por acción de la composición MG2327 y sus polipéptidos antiproliferativos), lo que demuestra que tanto MG2327 como sus polipéptidos antiproliferativos tienen actividad anti-angiogénica.

La apoptosis, la actividad anti-angiogénica y la selectividad constituyen unas de las características más importantes de las composiciones objeto de esta invención, debido a su potencial actividad terapéutica y efecto protector contra el cáncer.

En la presente invención se divulga que las combinaciones de fragmentos de la familia de las Serralisinas con las prodigiosinas son más potentes y selectivas que cuando se usan de manera independiente como agentes anticancerosos. Estos polipéptidos pueden usarse en la obtención de toxinas o inmunotoxinas recombinantes para la profilaxis y terapia del cáncer, u otras enfermedades relacionadas con la proliferación de células endoteliales y transformadas. Estos polipéptidos y su posible combinación con las prodigiosinas son aplicables a la industria farmacéutica para la obtención de preparados vacunales, composiciones terapéuticas o reactivos diagnósticos de uso humano o animal contra el cáncer u otras patologías de tipo proliferativo, que son altamente selectivas y tienen amplio espectro de acción.

### **Descripción de las figuras**

Figura 1. La interacción de *S. marcescens* con las células tumorales GB Hep.1 genera cepas bacterianas con alta capacidad anti-proliferativa y modificación en su expresión de proteínas. A- Supervivencia celular. Después de 72 horas, la supervivencia celular se estimó mediante el procedimiento del MTT. La cepa CMIB 4202 mostró un fuerte efecto anti-proliferativo sobre las células cancerosas humanas HEp-2, mientras que el efecto de la cepa SM1995 fue muy débil. Estos resultados fueron el promedio de tres experimentos independientes usando cuatro duplicados por muestra. B-Electroforesis SDS-PAGE (tinción de plata). CMIB 4202 sobre-expresó proteínas solubles de migración a la altura de 25 y 50 kDa.

Figura 2. Actividad anti-proliferativa de las fracciones de 25 y 50 kDa sobre la línea celular HEp-2. La viabilidad

celular se determinó por el procedimiento del MTT y se expresó en porcentajes con respecto a las células control. Las fracciones se recuperaron de los geles SDS (teñidos con cinc-Imidazol) y se renaturalizaron. La fracción a la altura de 25 kDa mostró una fuerte actividad anti-proliferativa ( $CI_{50}$  0,35 nM/ml), mientras que p50 no pudo inhibir el crecimiento. Al añadir  $Zn_4SO_2$  5  $\mu$ M a la p50, se observó un aumento de la actividad anti-proliferativa ( $CI_{50}$  45 nM/ml) aunque esta se mantuvo por debajo de la de la p25. Las curvas se generaron a partir de los valores medios obtenidos en 5 experimentos independientes y se representan con la desviación estándar (SD) correspondiente.

Figura 3. Cinética de expresión de proteínas y prodigiosina por la cepa CBMI 4202. La expresión de prodigiosinas en el medio de cultivo se produce durante el periodo de transición desde la fase de crecimiento a la fase estacionaria, donde CBMI 4202 alcanza su mayor tiempo de duplicación. A- Cinética del tiempo de duplicación celular. B- Eficiencia de la expresión de la prodigiosina (producto/biomasa). C- Cinética del efecto anti-proliferativo sobre células HEP-2, determinado por el procedimiento del MTT. D- Cinética del crecimiento celular determinado por densidad óptica y biosíntesis de proteínas.

Figura 4. Sensibilidad de células tumorales y normales humanas al tratamiento con MG2327. Las células normales tienen una baja sensibilidad y las de origen hematopoyético son menos sensibles que el resto de las líneas celulares analizadas. Mientras que las células activadas para su crecimiento (HUVEC bFGF) y las células derivadas de lesiones tumorales malignas son más sensibles.

Figura 5. Análisis de la supervivencia de ratones BALB/c tratados o no con la preparación MG2327 y expuestos al tumor CBHep1. A- La dosis de 1 mg/kg indujo una regresión de los tumores en el 60 % de los animales tratados, mientras que el 100 % de los animales no tratados murió en el término de 60 días. B- Después de 45 días desde la inoculación de las células tumorales, los animales no tratados presentaban un estado extremadamente depauperado, con presencia de tumores sólidos y ascitis, mientras que los tratados con 1 mg/kg no presentaron evidencias de tumor y sobrevivieron durante más de 300 días.

Figura 6. Efecto antitumoral de MG2327 sobre el modelo tumoral 3T316. A- La gráfica de las medias diarias por grupo reveló diferencias estadísticamente significativas entre los volúmenes tumorales de los animales tratados y no tratados ( $p < 0,003$ ). El análisis del crecimiento del tumor en el tiempo no varió de forma significativa ( $p = 0,109$ ) para el grupo tratado con MG2327, mientras que el grupo control negativo presentó un incremento significativo de este parámetro ( $p = 0,04$ ). B- Supervivencia de los animales tratados y no tratados.

Figura 7. Aislamiento de los principios activos proteicos desde MG2327. (A) Electroforesis SDS-PAGE (12,5 % de poliacrilamida) revelada mediante tinción con Coomassie. En el carril 1 se observa la muestra correspondiente a la elución con 0,2 M NaCl, pH 8,00, en el que se puede apreciar una banda de proteínas a la altura de 50 kDa. El carril 2 muestra una banda de proteínas de 25 kDa. (B) Efecto anti-proliferativo sobre HEP-2 de las proteínas p-25 y p-50 sobre las células tumorales humanas. Relación dosis-respuesta a p25, p-50 y MG2327 expresada en concentración de proteínas totales.

Figura 8. Efectos anti-proliferativos de los principios activos aislados desde MG2327 sobre las células HEP.2. Las proteínas de 50 y 25 kDa contenidas en MG2327 mostraron actividad inhibitoria del crecimiento. La combinación de estas proteínas con las prodigiosinas disminuyó la dosis capaz de inhibir el 50 % de las células tumorales con respecto al control ( $CI_{50}$ ).

Figura 9. SDS-PAGE y transferencia Western Blot. (A) Patrón de proteínas obtenido desde MG2327 usando SDS-PAGE (12 %) (con tinción de plata). Las bandas de proteínas de 50 y 25 kDa aproximadamente (flechas) se cortaron desde un gel similar teñido con Imidazol-Zinc, se renaturalizaron y se volvieron a pasar en un nuevo SDS-PAGE. Este se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se desarrolló la transferencia Western con anticuerpo policlonal anti-p50 obtenido en cabras. Los anticuerpos policlonales reconocieron la p25 y las degradaciones de la p50 y no reconocieron las bandas de proteínas no relacionadas (C. neg.).

Figura 10. Autólisis de la p50. A- Electroforesis SDS PAGE: 1- 24 1C, 2- 37 1C, 3- 45 1C, 4- 60 1C, 5- 4 1C. B- El análisis por densitometría de la p50 y p25 mostró que con el aumento de la temperatura de incubación disminuye la intensidad de la banda de p50, mientras que la intensidad de la banda de p25 aumenta.

Figura 11. p50 purificada por cromatografía DEAE Sepharosa Fast Flow. La p50 (eluida con 0,2 M NaCl), generó degradaciones con mayor actividad anti-proliferativa que la molécula parental.

Figura 12. Actividad enzimática de p25 y p50 obtenidas desde cromatografías independientes. A- p25 no presenta actividad alguna, mientras que p50 mostró actividad enzimática. B- La actividad enzimática de p50 fue totalmente inhibida con 7 mM de EDTA.

Figura 13. MG2327 indujo fragmentación del ADN dependiente del tiempo de incubación con la célula tumoral P3X63Ag8. Desde las 6 h de incubación, se observan fragmentos de oligonucleosomas que se incrementaron con el

tiempo, hasta alcanzar el patrón típico de apoptosis con oligonucleosomas de 180-200 pares de bases a las 24 h.

Figura 14. Ultraestructura de células de mieloma murino P3X63AG8 tratadas y no tratadas (células control) con 22  $\mu\text{g/ml}$  de MG2327. (A) La microfotografía electrónica control negativo del mieloma murino P3X63AG8 mostró una estructura típica del citoplasma y núcleo de células normales, donde la matriz mitocondrial presentaba mayor densidad que el citoplasma circundante ( $\blacktriangle$ ). (B) Cuerpos vacuolizados derivados en parte de mitocondrias alteradas ( $\blacktriangle$ ), aumento de volumen mitocondrial y ruptura de las crestas mitocondriales que se observan en el citoplasma ( $\blacktriangle$ ), con núcleos normales ( $\blackstar$ ) 2 horas después del tratamiento con MG2327. (C, D) Las agrupaciones en forma de racimos de las mitocondrias y las crestas individuales se fusionan ( $\blacktriangle$ ), también observadas a las 2 horas de tratamiento en (B). (E) La macrofotografía electrónica presenta morfología apoptótica: condensación ( $\blacksquare$ ), marginación y fragmentación de la cromatina ( $\blacksquare$ ), y cuerpos apoptóticos ( $\triangle$ ), a las 6 h del tratamiento con MG2327. (F) La apoptosis reveló cromatina compactada, el núcleo mostró parches periféricos de cromatina compactada. Cabe destacar el aumento del volumen mitocondrial y la rotura de las crestas, y la integridad de la membrana citoplasmática estuvieron presente en todos los tiempos analizados. Aumentos: x6000 (E), x 10 000 (A, B, D), 15 000 (C) Y x40 000 (F).

Figura 15. Efecto de MG2327, p25 y p50 (purificadas por cromatografía) sobre la diferenciación de células endoteliales en matrigel. Las células HMEC se cultivaron en condiciones de activación (10 ng/ml EGF, 1  $\mu\text{g/ml}$  de hidrocortisona) en presencia de concentraciones similares de MG2327 (A), p50 (B) y p25 (C), en ausencia de tratamiento (E) y sin activar (D). En el gráfico (F) se agrupan los resultados de tres experimentos independientes, que muestran la actividad inhibitoria de MG2327 y sus componentes sobre la formación de redes tubulares en matrigel. Tanto MG2327 como p50 logran revertir por completo la activación inducida hasta el nivel de las células no activadas (ANOVA MG2327, p50 y CN  $p > 0,05$ ). Las células tratadas con p25 mostraron un índice de formación de redes inferior al observado para MG2327 y p50 (prueba t no pareada,  $p = 0,0107$  y  $p = 0,0498$ , respectivamente).

Figura 16. Supervivencia de ratones BALB/c inmunizados o no con MG2327 y expuestos a células de mieloma X63. Con el uso de tres y seis dosis de 1 mg/ml de MG2327 se observa el rechazo del tumor mieloides en el 100 % de los animales inmunizados.

## Ejemplos

### EJEMPLO 1. Obtención de la cepa CMIB4202.

Para obtener cepas bacterianas productoras de moléculas antitumorales, el tipo salvaje de *Serratia marcescens* SM1995 aislado de la superficie ventral de ratones BALB/c se mezcló con las células tumorales CB-Hep.1 (Alemán, MR., Valdés, R, Pérez, M., Ibarra, N., Reyes, B., González, M., Mendoza, O., Padilla, S., Agráz, A y Rodríguez, M. P. 2000. Biopharm 13:48-52) y se inocularon por vía intraperitoneal en ratones BALB/c, previamente inoculados 10 días antes con vaselina líquida pesada. Ocho días después de la inoculación de las mezclas celulares, se realizaron extracciones de fluido ascítico en días alternos. Se analizó la cinética del crecimiento del tumor y se realizó un control microbiológico de la ascitis de cada animal con regresión tumoral.

Las bacterias aisladas se cultivaron en diferentes medios y condiciones de cultivo. Los sobrenadantes de cultivos se filtraron en condiciones de esterilidad usando filtros de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  y la toxicidad de los mismos se evaluó sobre las células CB Hep.1. La cepa de mayor citotoxicidad se depositó con el número de acceso CMIB4202 en la Colección de Microorganismos de Importancia Biotecnológica en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de Habana, Cuba. CMIB4202 y su cepa parental SM1995 se cultivaron en paralelo en fermentadores de 5 l, en medio de Peptona-Glicerol a 28 °C. El filtrado estéril de CMIB4202 presentó actividad dependiente de la dosis, mientras que el de SM1995 tuvo muy poca actividad sobre la línea de células cancerosas humanas HEp-2 (Fig.1A) en el ensayo anti-proliferativo usando el procedimiento del MTT (Skehan, P., Storeng, R, Scudiero, D., Monks, A, McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. 1., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M. R 1990. J. Natl. Cáncer. Inst. 25 82: 11 07).

La cepa CMIB4202 sobreexpresó proteínas solubles en el intervalo de 45-50 y 20-30 kDa (50 y 25 kDa determinado por SDS-PAGE, con un coeficiente de determinación de 0,984), Fig. 1B.

La fracción p25 recuperada a partir de las bandas presentes en los geles de SDS teñidos con Imidazol-cinc (Hardy, E., Santana, H., Sosa, A, Hernández, L., Fernández Padrón, C. and Castellanos-Serra, L. 1996. Analytical Biochemistry. 240: 150) mostró una fuerte actividad anti-proliferativa dependiente de la dosis sobre HEp-2, mientras que la fracción de p50 no inhibió el crecimiento celular. Sin embargo, cuando p50 se incubó con  $\text{Zn}_2\text{SO}_4$  5  $\mu\text{M}$  mostró actividad anti-proliferativa, pero menor que la observada para la fracción p25 (Fig. 2). La  $\text{CI}_{50}$  de las fracciones p25 y p50 fueron 0,48 nM y 16 nM, respectivamente.

Con el objetivo de comparar la capacidad de las dos cepas para expresar las dos proteínas, se realizó un ANOVA

factorial. El valor de la probabilidad de la interacción demostró que esta no era significativa ( $P=0,93$ ). Por otro lado, la probabilidad de ambos efectos principales mostró que ambas proteínas se expresan en cantidades significativamente diferentes ( $P=0,01$ ) Y que la cantidad es fuertemente dependiente de la cepa ( $P=0,0004$ ). Además, existieron diferencias extremadamente significativas de la expresión de estas proteínas entre ambas cepas ( $P<0,001$ ).

#### EJEMPLO 2. Obtención de la preparación anti-proliferativa MG2327.

Para obtener una preparación anti-proliferativa a partir de la cepa CMIB 4202 de *S. marcescens*, se realizó el cultivo de 1 L del microorganismo en condiciones y medios de cultivo óptimos para producir las moléculas de interés (Fig. 3). El cultivo de CMIB4202 fue centrifugado a 12 000 g y a 4 °C por 30 minutos. El sobrenadante fue colectado y posteriormente filtrado mediante corte molecular hasta 0.2 µm, bajo condiciones estériles. El volumen del sobrenadante fue reducido 10 veces usando una membrana de 10 kDa de límite de exclusión, y dializado contra PBS a 4 °C durante 24 h, en condiciones fisiológicas. El material dializado fue filtrado en condiciones estériles, y 5 20 mL fueron dispensados en viales de cristal apirogénicos. La preparación fue almacenada a 4 °C y denominada MG2327. El escalado a fermentadores de 5 L se realizó con las condiciones establecidas: medio peptona-glicerol a 28°C por 14 h, aireación 1 vvm, 250 rpm y 0.1 de densidad óptica inicial. El medio de cultivo fue ajustado a pH fisiológico y la fermentación se realizó a pH libre neutro. Los restantes pasos se realizaron de igual forma que en el agitador.

#### EJEMPLO 3. Caracterización de la actividad anti-proliferativa de la preparación MG2327 "in vitro".

Para la caracterización de la actividad anti-proliferativa de la preparación MG2327 "in vitro" se evaluó un panel de líneas humanas (tabla 1). Un total de 2000 células, excepto para PBMC (20000), fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos, y se añadieron diferentes concentraciones de la preparación MG2327. Después de 72 horas, se estimó el número de células sobrevivientes por adición de MTT (Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. and BOYD, M. R. 1990. *J Natl Cáncer Inst.* 82:1107). Los productos de formazan solubles fueron detectados a 540 nm en un lector de placas Multiscan. La preparación MG2327 mostró un amplio rango de actividad citotóxica contra las líneas celulares humanas analizadas. La  $CI_{50}$  estuvo en el rango de los µg/m.

Tabla 1. Células y medias de cultivos empleados en los estudios "in vitro"

FIBHUM	FIBROBLASTOS DERIVADOS DE PREPUCIO HUMANO, PASES 3-6	DMEM, 15 % FBS*, INSULINA 30 µg/ml
H82	Carcinoma pulmonar humano	RPMI 1640, 10 % FBS
MDA-MB145S	Adenocarcinoma de mama humano	DMEM, 10 % FBS
Colo-205	Carcinoma de colon humano	RPMI 1640, 10 % FBS
HT1080	Fibrosarcoma humano	DMEM, 10 % FBS
Hela	Carcinoma cervical humano	DMEM, 10 % FBS
Hep-2	Carcinoma laríngeo humano	MEM, 10 % FBS
HEpG2	Hepatocarcinoma humano	DMEM, 10 % FBS
A375	Melanoma humano	DMEM, 10% FBS
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica humana	RPMI 1640, 10% FBS, IL-2

HuT78	Lirifoma de células T cutáneo humano	RPMI1640, 10 % FBS
HL60	Leucemia promielocítica humana	RPMI 1640, 10 % FBS
K562	Eritroleucemia humana	RPMI 1640, 10 % FBS
CRL1682	Adenocarcinoma de páncreas humano	RPMI 1640, 10 % SFB
A 431	Adenocarcinoma de vulva humano	RPMI 1640, 10 % SFB
SiHa	Carcinoma cervical humano	RPMI 1640, 10 % FBS
CaSki	Carcinoma cervical humano	RPMI 1640, 10 % FBS
HUVEC	Células endoteliales vasculares humanas	M199 30 % SFB 10 ng/mL bFGF
*SFBS: Suero Bovino Fetal		

5 La selectividad de la preparación MG2327 fue comparada con el fármaco comercial Doxorubicina (DXR) empleando la línea celular HT1080 (originada de un fibrosarcoma) y fibroblastos primarios. Se empleó el ensayo anti-proliferativo descrito arriba. Se aplicaron diluciones seriadas de OXR y la preparación MG2327 partiendo de 10 µg/ml y se generó una curva con 5 puntos. La relación de mortalidad fue calculada para cada punta como la relación entre el porcentaje de mortalidad para HT1080 y el porcentaje de mortalidad para fibroblastos primarios. Las diferencias fueron mayores a las menores concentraciones testadas (MG2327 9: 1, OXR 1.7: 1). La preparación MG2327 fue altamente selectiva para concentraciones menores que 2 µg/ml.

10 Las células HEp-2 originadas de carcinoma laríngeo, son muy resistentes a los antitumorales empleados para uso clínico comparadas con el resto de las líneas estudiadas. Por esta razón, nosotros la empleamos como modelo para los estudios "in vitro" del efecto de la preparación MG2327. Una comparación de las curvas de citotoxicidad generadas sobre las células HEp-2 tratadas con compuestos antitumorales conocidos, mostró resultados similares (40 %) de proliferación a 3 µg/ml para la preparación MG2327, Cisplatino (COOP), Doxorubicina (OXR), Vincristina (VC), Vinblastina (VB) y Taxol (TX) ( $p > 0.05$ , test de ANOVA). En las mismas condiciones, otros antitumorales como Ara C, Metotrexato (MTC), Bleomicina (Bleo) y Ciclofosfamida (CPA), no mostraron efecto. COOP es uno de los antitumorales autorizados por la FOA para el tratamiento de cáncer laríngeo, y el Análisis de las curvas de supervivencia para la preparación MG2327 y COOP mostraron valores similares para la CI10, CI50 y CI90.

20 El estudio de sensibilidad de las diferentes líneas celulares cancerígenas 0 no (Fig. 4), demostró que las líneas de células normales son poco sensibles al preparado MG2327, mientras que melanoma, carcinoma laríngeo, fibrosarcoma, hepatocarcinoma, y carcinomas cervico-uterinos (portadores del virus del papiloma humano), son muy sensibles. Los carcinomas de origen hematopoyético son menos sensibles. Las células HUVEC activadas para su crecimiento son más sensibles a la preparación MG2327 que las no activadas.

25 Los resultados anteriores demostraron que la preparación MG2327 tiene amplio espectro de acción citotóxica sobre líneas de células malignas, con efecto selectivo sobre células tumorales/transformadas y células activadas para su crecimiento.

**EJEMPLO 4.** Actividad antitumoral de la preparación MG2327.

Para demostrar la actividad antitumoral de la preparación MG2327 se emplearon ratones BALB/c, a los que se les implantaron intraperitonealmente (Lp.) las células tumorales CB Hep.1 de origen mielóide, capaces de originar tumores ascíticos murinos (Fontirrochi, G., Duenas, M., Fernandez de Cossio, M.E., Fuentes, P., Pérez, M., Mainet, D., Ayala, M., Gavilondo, J.V. and Duarte, C.1993. *Biotechnol Aplic.* 10: 2430). Después de 10 días, a los ratones se les inyectó Lp. MG2327 o PBS. El 60 % de los animales tratados con 1 mg/kg de peso sobrevivieron, mientras que solo el 25 % de los controles vivieron hasta los 45 días Después de iniciado el tratamiento (Fig. 5). La regresión tumoral total fue observada en todos los animales tratados sobrevivientes, que mostraban un estado saludable, mientras que en los controles, los tumores progresaron formando grandes masas sólidas y mostraban un estado general depauperado.

Ratones BALB/c portadores de un tumor de fibroblastos transformados con E6/E7, incrementaron su supervivencia después de ser tratados con la preparación MG2327, con disminución significativa del volumen del tumor.

Además, para evaluar la actividad antitumoral de MG2327 también se usó un modelo de cáncer asociado al virus del papiloma humano (VPH16), desarrollado por Hernández et al. (Hernández, P., Merina, N., López-Ocejo, O. and Arana, Mo J. 2000. *Biochem Biophys Res Commun.*270:119-124) Dos grupos de ratones BALB/c fueron inoculados subcutáneamente (s.c.) con  $2 \times 10^6$  células 3T316 en la zona ventral izquierda. A las 48 horas se administró una dosis de 0.75 mg/kg de peso de MG2327 o PBS por vía subcutánea, cercano al sitio de inoculación primario de las células. Cuando se evidenciaron los tumores en el grupo control, se hicieron las mediciones diarias con un compás. El volumen tumoral se calculó usando la fórmula estándar  $V = 0,52 \times a^2 \times b$  donde b es el ancho y a es el largo del perímetro horizontal del tumor (Hernández, P., Merina, No, López-Ocejo, O. and Arana, M. J. 2000. *Biochem Biophys Res Commun.*270:119-124) y su comportamiento se muestra en la Fig. 6.

Las diferencias entre el tiempo de aparición del tumor fueron estadísticamente significativas ( $p=0.0054$ ) entre los animales tratados y los no tratados. El estudio de la relación tiempo-tratamiento por la prueba ANOVA, mostró que la misma magnitud de diferencia no se mantiene entre los grupos tratados y no tratados; 10 que indicó la existencia de una diferencia relacionada con el tratamiento aplicado a los animales.

Al aplicar una prueba de Wilcoxon para datos pareados a las mediciones entre los días 21 y 45 para cada grupo, se detectó un incremento significativo del volumen tumoral para el grupo control ( $p=0.043$ ), no así para el grupo tratado (Fig. 6A). Para analizar la existencia de diferencias significativas entre los grupos en cada momento de evaluación, se aplicó una prueba U de Mann-Whitney que detectó diferencias significativas, excepto para el primer punto ( $p<0.01$ ). Además, se detectó una importante diferencia en la velocidad de crecimiento del tumor. Las curvas de crecimiento fueron ajustadas a una línea y sus pendientes se calcularon a partir de la ecuación generada según el mejor ajuste. La comparación de las pendientes indicó que el tumor del grupo control creció a una velocidad significativamente mayor que la observada para el grupo tratado ( $p=0.0088$ ). Como resultado de la implantación del tumor, los ratones del grupo control murieron entre los días 45 y 64, mientras que los animales del grupo tratado comenzaron a morir hacia el día 52, con un 20 % de supervivencia que se mantuvo en el tiempo (170 días), Fig. 6B.

Ajustando los datos de supervivencia a un modelo jerárquico bayesiano (regresión de Weibull con 500 iteraciones) se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0,02447$ ), que fue corroborada al comprobarse que los intervalos de confianza para el tiempo medio de supervivencia fueron totalmente excluyentes.

**EJEMPLO 5.** Fraccionamiento de la preparación MG2327. Aislamiento de las biomoléculas no proteicas.

Para determinar la composición de la preparación MG2327 se realizó su fraccionamiento molecular y se evaluó su capacidad para inhibir el crecimiento celular in vitro de la línea celular tumoral humana HEp-2.

La fracción polisacárida ( $t_r = 6,85$  min) se separó por cromatografía en gel Aminex HPX 87-N (dimensiones: 300 x 7.8 mm, flujo: 0.5 ml/min). Se usaron patrones de fructosa  $t_r = 13.15$  min., glucosa  $t_r = 12.12$  min., disacárido  $t_r = 9.40$  min., trisacárido  $t_r = 8.24$  min., polisacárido  $t_r = 7.01$  min. La fracción pigmentada se separó mediante una columna TSK butilo de la MERCK equilibrada con fosfato 20 mM, pH=7, donde quedó retenida en la matriz, posteriormente se eluyó empleando etanol absoluto. El espectro de absorción (etanol 100 % a pH 5.00) del producto obtenido mostró una banda con un máximo entre 470 y 490 nm y un pico con máximo en 537 nm, que corresponden con la característica descrita de los monómeros y del dímero de la prodigiosina y, respectivamente, con la actividad anti-proliferativa que se ha descrito (Pérez-Tomas, R. and Montaner, B. 2003 *Histol. Histopathol.* 18: 379-385; Montaner, B., and Pérez Thomas, R. 2003. *Curr Cáncer Drug Targets.* 3:57-65). El polisacárido aislado no presentó efecto inhibitorio, mientras que la fracción correspondiente a la prodigiosina mostró actividad anti-proliferativa dependiente de la dosis.

**EJEMPLO 6.** Fraccionamiento de la preparación MG2327. Aislamiento de las biomoléculas proteicas con efecto anti-

proliferativo, mediante un solo paso cromatográfico: intercambio iónico con gradiente discontinuo de NaCl.

La preparación MG2327 fue aplicada a una matriz de DEAE Sepharosa Fast Flow, equilibrada con 50 mM de tampón fosfato, pH 8.00. La elusión se realizó con un gradiente discontinuo de Magi: 50 mM de tampón fosfato-0.1 M NaCl, pH 8.00; 50 mM de tampón fosfato-0.2 M NaCl, pH 8.00; 50 mM de tampón fosfato-2 M NaCl, pH 8.00 y finalmente se eluyó la fracción pigmentada absorbida a la matriz con etanol absoluto al 70 %.

La fracción correspondiente a 0.2 M NaCl, pH 8.00 y el primer eluato colectado de la fracción que no se pegó (pass), presentaron actividad inhibitoria dependiente de la dosis en el ensayo ya descrito. Por electroforesis SDS- PAGE se observó una banda de proteína a la altura de 50 kDa y una banda mayoritaria (pureza > 90 %) a la altura de 25 kDa, respectivamente (Fig. 7A). Los pesos moleculares fueron calculados mediante la función que relaciona el peso molecular del patrón comercial con la distancia de migración de las bandas;  $r^2 = 0,984$ .

La Figura 7B. muestra el efecto anti-proliferativo de p50 y p25 comparadas con la preparación MG2327. La p50 y la p25 presentaron efecto anti-proliferativo sobre HEp.2.

La Tabla 2 muestra los resultados comparativos entre p50, p25 Y el preparado MG2327, empleando el análisis estadístico de varianzas (ANOVA). Se realizó una comparación de la respuesta para cada dosis empleada. Se puede observar que existen diferencias significativas entre las actividades de las tres muestras analizadas. Estas diferencias dependen de la dosis empleada. Para altas concentraciones de los componentes de la preparación (9 y 18 µg/ml) existieron diferencias significativas entre la fracción de 25 y 50 kDa, donde la fracción de 25 kDa fue mas activa, no siendo así para bajas concentraciones (2.25 y 4.5 µg/ml).

Tabla 2. Resultados comparativos entre los componentes proteicos y la preparación MG2327, empleando el Análisis estadístico de varianzas (ANOVA).

Concentración (µg/mL)	ANOVA			
	Inter- muestras	25-50	25-MG2327	50-MG2327
2.25	0.0110	0.0649	0.0089	0.0958
4.5	0.0316	0.0685	0.0081	0.3728
9	0.0040	0.0318	0.0151	0.4271
18	0.0015	0.0243	0.3206	0.0243

Entre el componente proteico de 50 kDa y el preparado MG2327 existieron diferencias significativas para la dosis de 18 µg/ml donde el preparado fue mas activo, logrando la inhibición del crecimiento del 100 % de las células tumorales, mientras que el componente proteico de 50 kDa logró inhibir aproximadamente el 80 % del crecimiento. Para la dosis de 2.25, 4.5, Y 9 µg/ml no existieron diferencias significativas entre la respuesta ocasionada por la fracción de 50 kDa y el preparado MG2327.

Sin embargo, la actividad del componente proteico de 25 kDa fue significativamente diferente a la del preparado MG2327 para la dosis de 2.5, 4.5 y 9 µg/ml, donde el componente proteico de 25 kDa presentó mayor actividad biológica y para la dosis de 18 µg/ml no existieron diferencias significativas, ya que ambas muestras lograron inhibir el 100 % de las células tumorales.

Estos resultados evidenciaron que el componente proteico de 25 kDa tiene mayor capacidad para inhibir el crecimiento de las células tumorales, que el componente proteico de 50 kDa y que ambos componentes presentan actividad biológica in vitro de manera independiente.

Este esquema de purificación se repitió varias veces, lográndose resultados similares.

**EJEMPLO 7.** Composición de polipéptidos de Serralisina con prodigiosina.

Se formularon los componentes proteicos y la prodigiosina en una misma composición que aumentó significativamente ( $p < 0.005$ ) el efecto inhibitorio con respecto a su efecto de forma independiente. En la Fig. 8 se grafica la  $CI_{50}$  de las biomoléculas antiproliferativas que aislamos de la preparación MG2327 y sus composiciones. La preparación MG2327 esta referida a proteínas totales. Las composiciones fueron realizadas manteniendo la misma relación de proteínas y prodigiosina que las empleadas cuando se evaluaron los componentes de forma

independiente. En dichas composiciones la prodigiosina puede encontrarse a una concentración de 0.1 – 100 nM, y los fragmentos de Serralisinas de 0,1 - 150 µg/ml.

**EJEMPLO 8.** p50 genera p25.

5 Se usaron anticuerpos anti-p50 obtenidos en ovejas para conocer la relación entre p25 y p50. MG2327 fue aplicada a un gel SOS-PAGE al 12 % y tenido con Imidazol-Zinc (Hardy, E., Santana, H., Sosa, A., Hernández, L., Fernandez-Padrón, C. and 5 Castellanos-Serra, L. 1996. Analytical 'biochemistry. 240:150-152). Las bandas de proteínas de 50 y 25 kDa, aproximadamente (Fig. 9) fueron cortadas, renaturalizadas en gel y reaplicadas a SOS-PAGE. Este fue transferido a membrana de nitrocelulosa y el Western Blot fue realizado. Los anticuerpos policlonales anti-p50 reconocieron la p25 y las degradaciones de la p50. Las tallas moleculares fueron estimadas con marcadores de peso molecular antes de la tinción (Bio-Rad). El Western blot presentado aquí es representativo de tres experimentos similares.

**EJEMPLO 9.** Los productos de la degradación de p50 originados por temperatura son más activos que la propia p50.

15 La p50 obtenida en el ejemplo 6 fue incubada a diferentes temperaturas y su actividad anti-proliferativa fue testada sobre HEP.2, usando el procedimiento del MTT ya descrito anteriormente. El patrón de degradaciones generado para cada condición (4, 37, 45 y 60 °C) se cuantificó mediante densitometría.

La generación de fragmentos producto de la degradación fue directamente proporcional con el aumento de la temperatura, por 10 que a medida que la cantidad de p50 disminuye se incrementa la p25 como producto de la degradación de p50 (Fig. 10). Los productos de la degradación de p50 mostraron mayor actividad anti-proliferativa que la p50 íntegra (Fig. 11).

20 **EJEMPLO 10.** p25 induce regresión de tumores malignos.

La proteína p25 obtenida por la cromatografía descrita en el Ejemplo 6, fue aplicada a cromatografía de fase inversa (RP-HPLC), para comprobar su homogeneidad y pureza. Se empleó un gradiente de acetonitrilo de 0-100 en 100 min. Se observó un pico de proteínas con pureza mayor del 90 %, demostrando la homogeneidad del eluato purificado.

25 La p25 fue entonces inyectada i.p. a ratones BALB/c Después de 8 días de implantado el tumor mieloides P3X63Ag8 y perfectamente desarrollado. La dosis de 22 IJg/kg de peso de p25 indujo regresión total en el 80 % de los animales tratados. Los controles negativos murieron en el término de 30 días, donde habían ya desarrollado tumores sólidos.

**EJEMPLO 11**

30 p50 es una metaloproteasa, mientras que p25 no tiene actividad proteolítica. El procedimiento de Anson y Mirsky modificado (Anson, M.L., Mirsky, AE. 1932. J. Gen. Physiol. 16: 59) usando caseína como sustrato, fue ajustado en nuestro laboratorio con tripsina ( $y=1,9314x-0,682$ ;  $R^2=0.999$ ). Las fracciones proteicas obtenidas en la cromatografía descrita en el Ejemplo 6 fueron ensayadas con este procedimiento. P50 presentó actividad proteolítica que fue inhibida con 7 mM de EDTA, por 10 que resultó ser una metaloproteasa. P25 no presentó actividad enzimática, Fig. 12.

35 El procedimiento de cromatografía en gel usando gelatina como sustrato (Vacca, A, Iurlaro, M., Ribatti, D., Minischetti, M., Nico, B., Ria, R., Pellegrino, A and Dammacco, F. 1999. Blood. 94:4143-4155) fue empleado para verificar la actividad proteolítica de p50 y p25. Además se analizó la capacidad enzimática de las degradaciones de la p50. En este ensayo la proteína p50 obtenida por la cromatografía descrita en el EJEMPLO 6 presentó actividad enzimática. La fracción proteica de la banda de gel a la altura de 25 kDa (desde MG2327) mostró actividad proteolítica, mientras que la p25 obtenida por cromatografía no mostró esta actividad.

40 **EJEMPLO 12.** Identificación de los polipéptidos anti-proliferativos de 25 kDa desde MG2327.

45 Para la identificación de las proteínas con actividad anti-proliferativa presentes en la banda de 25 kDa, se cortó el gel SDS-PAGE (descrito en el Ejemplo 8) con MG2327 aplicado. La banda fue incubada durante 5 min en 1 ml de tampón Tris/HCl (100 mM pH 8.5) hasta que estuvo completamente transparente. La banda se cortó en pequeños cubos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>, embebidos con acetonitrilo, rehidratados en un volumen mínimo de bicarbonato de amonio (25 mM) que contenía tripsina o LEP a una concentración de 12,5 ng/µl. La digestión en gel se incubó a 37°C durante 18 h en un mezclador termostático.

50 Los péptidos resultantes de la digestión LEP fueron analizados por MALDI-MS. Los iones monoisotópicos de las señales más intensas fueron introducidos en el programa ProFound para la identificación de la proteína de interés en la base de datos de secuencias. Aunque nosotros no realizamos ninguna restricción taxonómica durante la búsqueda

5 en la base de datos, la proteasa de 50 kDa de *Serratia marcescens* EC 3.4.24.40 fue alineada como la de mayor similitud. Cuatro péptidos (51-57, 58-66, 6780 y 81-90) pertenecieron a la región N-terminal y uno (402-409) perteneció a la región C-terminal de la proteína. La talla molecular EC 3.4.24.40 difiere de las presentes en la banda analizada (aproximadamente 25 kDa, estimada por SDS-PAGE). Este hallazgo sugiere que la banda de 25 kDa contiene dos fragmentos que migraron conjuntamente de 25 kDa con similitud a la proteína de 50 kDa EC 3.4.24.40 perteneciente a la familia de las Serralisinas.

10 Para corroborar esta hipótesis, se desarrolló una digestión trípica de las proteínas de la banda de 25 kDa. El espectro ESI-MS de los péptidos extraídos se desenredó y las señales más intensas fueron introducidas en el programa Profound. La salida mostró la misma proteína identificada previamente (EC 3.4.24.40). La cobertura de secuencia de la digestión trípica (21 %) fue mayor que la digestión previa (10 %). El mapa de cobertura de secuencia mostró siete péptidos que coincidieron muy bien con algunos de los fragmentos trípticos de las proteínas PRZN\_SERMAIPRZN\_SERSP. Cinco de ellos (28-41, 58-66, 67-80, 81-90 and 163171) correspondieron a la región N-terminal, mientras que los dos péptidos restantes (351-373 and 374-393) pertenecieron a la región C-terminal. Estos resultados no solo confirmaron la identificación previa de la proteína, sino que también la cobertura del mapa sugiere la presencia de dos fragmentos co-migrantes de 25 kDa de las proteínas identificadas como PRZN\_SERMAIPRZN\_SERSP, en la banda analizada. El espectro ESI-MS/MS correspondiente a péptidos de las regiones del N- y C-terminal de las proteínas previamente mencionadas fueron interpretados manualmente y las secuencias parciales fueron extraídas para su identificación, Tabla 3.

20 Tabla 3. Interpretación manual del espectro ESI-MS/MS de 5 péptidos presentes en la banda de 25 kDa. Los péptidos del 1-4 pertenecieron a la región N-terminal de las proteínas PRZN\_SERMAIPRZN\_SERSP, mientras que el péptido 5 corresponde a la región C-terminal de estas mismas proteínas.

m <sub>1</sub>	Marcador de la secuencia	m <sub>2</sub>	Secuencia peptídica	z	m/z previsto	m/z teórico	Error
705,47	AQENS	1235,74	28-41	2	792,91	792,89	0,02
522,28	TFSF	1004,54	58-66	2	559,29	559,28	0,01
677,38	AVN	961,58	67-80	2	692,35	692,34	0,01
730,40	EAS	1017,58	81-90	2	582,79	582,79	0,00
1117,84	GGFX	1493,08	351-373	2	1031,45	1031,48	0,03

25 Con los procedimientos empleados y los resultados obtenidos podemos concluir que en la banda de 25 kDa analizada existe una mezcla de proteínas que contiene fragmentos con similitud al N- y C-terminal de las proteínas PRZN\_SERMAIPRZN\_SERSP.

#### EJEMPLO 13. Identificación de la proteína p50.

30 Para identificar la proteína p50 con actividad anti-proliferativa, la fracción proteica correspondiente a la proteína de 50 kDa obtenida del protocolo de purificación descrito en el Ejemplo 6 fue digerida con endoproteinasa Lys-C. La identificación de los péptidos se realizó mediante secuenciación por degradación Edman automatizada y un espectrómetro de masas de doble sector JMS HX-110, con cánón FAB. Con los resultados obtenidos y los alineamientos realizados mediante el software Swissprot y PIR se concluyó que dicha proteína pertenece a la familia de las Serralisinas con un peso molecular de 50 kDa. La mayor similitud se encontró para las especies con identificadores PRZN\_SERSP y PRZN\_SERMA en el banco Swissprot. La masa molecular de todos los péptidos analizados por espectrometría de masas coincidió con los valores teóricos esperados para péptidos de estas proteínas digeridas con endoproteinasa Lys-C.

#### EJEMPLO 14. Identificación de la p25 purificada por cromatografía.

40 Para identificar la proteína de 25 kDa con actividad anti-proliferativa, apoptótica y antiangiogénica, la p25 purificada por la cromatografía DEAE descrita en el Ejemplo 6 fue aplicada a SDS-PAGE. La banda de proteína fue lavada durante cinco minutos con 500 µl de agua y Después se destiñó con una solución de ácido cítrico 100 mM, posteriormente fue lavada nuevamente con agua MilliQ, cortada en pequeños cubos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. Después, se le añadió acetonitrilo hasta su deshidratación y su exceso fue eliminado. Los cubos de gel fueron deshidratados completamente en una centrifuga evaporadora y posteriormente rehidratados en una solución de

bicarbonato de amonio (50 mM) que contenía tripsina a una concentración de 12.5 ng/μl. Luego se incubaron durante 30 minutos a 37°C en un mezclador termostático durante toda la noche.

5 Los péptidos se eluyeron pasivamente al añadir 20 μl en una solución de bicarbonato de amonio y una incubación adicional a 37°C durante 45 minutos. Los péptidos fueron extraídos mediante el empleo de unos ZipTipC18™ y posteriormente se aciduló la mezcla de reacción al añadir 5 μl de ácido fórmico puro y se extrajeron nuevamente los péptidos mediante el empleo de los ZipTipC18™. Los péptidos adheridos a los ZipTipC18™ fueron lavados repetidamente con una solución de ácido fórmico al 5 % Y posteriormente eluidos en un volumen de 2-3 μl de una solución de acetonitrilo al 60 % que contenía ácido fórmico al 1 %.

10 El péptido originado durante la digestión se cargó en unas agujas de capilares de borosilicato cubiertos en oro e introducidos en la fuente de ionización del espectrómetro de masas híbrido de geometría ortogonal equipado con una fuente de nanospray (QTOF-2TM).

15 Los espectros de masas ESI-MS fueron adquiridos en un rango 350-2000 Da durante 1 segundo. Las señales mas intensas fueron seleccionadas para su posterior secuenciación por ESI-MSMS. El gas de colisión empleado fue el argón y se usó una energía de colisión apropiada para producir una fragmentación extensiva de los péptidos seleccionados, que permitiese su identificación en las bases de datos de manera inequívoca. Los espectros ESI-MS fueron desenredados y exportados en un formato DTA e importado en el programa MASCOT para la identificación de la proteína en las bases de datos SWISSPROT y NCBI nr mediante la estrategia del Peptide Mass Fingerprint (PMF). Para una identificación correcta de la proteína se usó una calibración interna al emplear un péptido autoproteolítico de la tripsina y se fijó un error de 0.05 Da para realizar la búsqueda de los péptidos observados en el espectro y se seleccionaron aquellas señales que tenían una intensidad superior al 10 % de la intensidad del pico base.

20 Cuatro péptidos presentes en la banda analizada fueron secuenciados por ESI-MSMS (Tabla 4). Estos péptidos pertenecieron a la región C-terminal de las proteínas PRZN\_SERMAIPRZN\_SERSP (indicados en rojo en las secuencias de la Tabla 6), previamente identificadas en los Ejemplos anteriores.

25 Tabla 4. Péptidos pertenecientes a la p25 de *S. marcescens* que se secuenciaron mediante ESI-MSMS.

Nº	Secuencia de aminoácidos	m/z teor.	m/z prev.	Error	SEC ID Nº
1	<b>DFLSTTSNSQK</b>	<b>1226,51</b>	<b>1226,58</b>	0,07	SEC ID Nº 10
2	<b>SAASDSAPGASDWIR</b>	<b>1489,75</b>	<b>1489,68</b>	0,07	SEC ID Nº 11
3	<b>GGAGNDVLFGGGGADELWGGAGK</b>	<b>2060,96</b>	<b>2060,87</b>	0,11	SEC ID Nº 12
4	<b>TGDTVYGFNTGR</b>	<b>1488,665</b>	<b>1488,60</b>	0,05	SEC ID Nº 13

30 También se encontraron otras señales que aunque no se secuenciaron, sus valores de masas concuerdan muy bien con los valores de masas esperados para los péptidos trípticos de la región C-terminal de las proteínas identificadas como PRZN\_SERMAIPRZN\_SERSP, Tabla 5 (señalados en azul en la Tabla 6). Entre estos péptidos aparece una señal doble cargada que pudiera corresponder con el péptido C-terminal de las proteínas PRZN\_SERMAIPRZN\_SERSP. No se encontraron péptidos que pudieran ser asignados a cortes específicos de la región N-terminal de las proteínas PRZN\_SERMAIPRZN\_SERSP.

Tabla 5. Péptidos trípticos pertenecientes a la proteína PRZN\_SERMA detectados en el espectro ESI-MS.

Nº	Secuencia de aminoácidos	m/z prev.	m/z calc.	z	error	SEC ID Nº
1	<sup>325</sup> <b>SFSDVGGLK</b> <sup>313</sup>	<b>455,20</b>	<b>455,24</b>	2	0,04	SEC ID Nº 14
2	<sup>417</sup> <b>IDLSFFNK</b> <sup>424</sup>	<b>492,24</b>	<b>492,26</b>	2	0,02	SEC ID Nº 15

3	<sup>475</sup> IVGQVDVARDFIV <sup>487</sup>	688,35	688,38	2	0,03	SEC ID N° 16
---	---	--------	--------	---	------	-----------------

Con los procedimientos y resultados presentados en este ejemplo podemos afirmar que en la banda de 25 kDa obtenida de la p25 purificada por cromatografía DEAE y altamente anti-proliferativa, esta presente un fragmento C-terminal de 25 kDa de las proteínas PRZN\_SERMA/PRZN\_SERSP.

- 5 Tabla 6. Identificación de la p50 y p25 obtenidas por cromatografía DEAE. En la secuencia están tachados los aminoácidos que no están presentes en la proteína madura. Sin estos aminoácidos los pesos moleculares de estas proteínas son 50595.4 Da y 50293.4 Da para PRZN\_SERSP y PRZN\_SERMA, respectivamente. La identificación de los péptidos trípticos que difieren entre ambas moléculas indica que ambas especies pueden estar presentes e incluso coexistir (verde (*cursiva*): identificado por espectrometría de masas y marrón (subrayado): identificado por degradación Edman dentro del rectángulo continuo). Los péptidos se marcaron y se identificaron en la p25 obtenida por la cromatografía descrita en el Ejemplo 6. Los péptidos marcados y subrayados se identificaron en la p50 obtenida mediante la cromatografía descrita en el Ejemplo 6 y el péptido en (*cursiva*) se identificó a partir de un fragmento de gel.

PRZN SERMA	<u>MQSTKKAIEITESSLAAATTGYDAVDDLHYHERGNGIQINGKDSFSNEQAGLFITRENO</u>
PRZN SERSP	<u>MQSTKKAIEITESNFAAATTGYDAVDDLHYHERGNGIQINGKDSFSNEQAGLFITRENO</u>
	*****
PRZN SERMA	<u>TWNGYKVEGQPVKLTFSFPDYKFSSTNVAGDTGLSKFSAEQQQQAKLSLQSWADVANITF</u>
PRZN SERSP	<u>TWNGYKVEGQPVKLTFSFPDYKFSSTNVAGDTGLSKFSAEQQQQAKLSLQSWADVANITF</u>
	*****
PRZN SERMA	<u>TEVAAGQKANITFGNYSQDRPGHYDGTQAYAFLEPNTIWQGQDLGGQTWYVNVNQS<del>NVKHE</del></u>
PRZN SERSP	<u>TEVAAGQKANITFGNYSQDRPGHYDGTQAYAFLEPNTIWQGQDLGGQTWYVNVNQS<del>NVKHE</del></u>
	*****
PRZN SERMA	<u>ATEDYGRQTF<del>THEIGHALGLSHPGDYNAGEGNPTYNDVTYAEDTRQFSLMSYWSETNTGG</del></u>
PRZN SERSP	<u>ATEDYGRQTF<del>THEIGHALGLSHPGDYNAGEGNPTYRDVTYAEDTRQFSLMSYWSETNTGG</del></u>
	*****
PRZN SERMA	<u>DNGGHYAAAPLLDDIAAIQHLYGANPSTR<del>TGDTVYGFNSNTGRDFLSTTSNSQKVI</del>FAAW</u>
PRZN SERSP	<u>DNGGHYAAAPLLDDIAAIQHLYGANLSTR<del>TGDTVYGFNSNTGRDFLSTTSNSQKVI</del>FAAW</u>
	*****
PRZN SERMA	<u>DAGGNDTDFDFSGYTANQRINLNEK<del>SFSDVGGGLKGNVSIAGVTIENAI</del>GGSGNDVIVGNA</u>
PRZN SERSP	<u>DAGGNDTDFDFSGYTANQRINLNEK<del>SFSDVGGGLKGNVSIAGVTIENAI</del>G-FRQLIVGNA</u>
	*****
PRZN SERMA	<u>ANNVLKGGAGNDVLFGGGGADELWGGAGK<del>DI</del>FVFS<del>SAASDSAPGASDWIRDF</del>QKGI<del>DKIDL</del></u>
PRZN SERSP	<u>ANNVLKGGAGNDVLFGGGGADELWGGAGK<del>DI</del>FVFS<del>SAASDSAPGASDWIRDF</del>QKGI<del>DKIDL</del></u>
	*****
PRZN SERMA	<u>SF<del>FNKEANS</del>SDFIHFVDHFS<del>GTAGEALLSYNASSNVTDLSVNI</del>GGHQAPDFLVKIVGQVD</u>
PRZN SERSP	<u>SF<del>FNKEA</del>QSSDFIHFVDHFS<del>GAAGEALLSYNASNVTDLSVNI</del>GGHQAPDFLVKIVGQVD</u>
	*****
PRZN SERMA	<u>VATDFIV</u>
PRZN SERSP	<u>VATDFIV</u>
	*****

**EJEMPLO 15.** Proteínas del N- y C- terminal con 25 kDa.

Para determinar la talla molecular de las proteínas que pudieran coexistir a la altura de 25 kDa en SDS-PAGE, originadas a partir de degradaciones de PRZN\_SERMAIPRZN\_SERSP, sus secuencias fueron introducidas en el programa GenRun. Los fragmentos correspondientes al N- y C-terminal de 25 kDa ( $\pm 2$  kDa) son mostrados en la Tabla 7.

- 5 Tabla 7. Proteínas con un tamaño de de  $25 \pm 2$  kDa, originadas a partir de degradaciones de RZN\_SERMAIPRZN\_SERSP. El peso molecular fue determinado mediante el programa GenRun, a partir de los extremos N- y C-terminal.

Proteína	Secuencia	SEC ID N°
ARA1	<b>MSYWSETNTGGDNGGHYAAAPLLDDIAAIQHLYGANPSTRTGDTVYGFNSNTGRDFLSTT SNSQKVIFAAWDAGGNDTDFDFSGYTANQRINLNEKSFSDVGGGLKGNVSIAGVTIENAIG GSGNDVIVGNAANNVLKGGAGNDVLFGGGGADELWGGAGKDI FVFSAAASDSAPGASDWIR DFQKGIKIDLSFFNKEANSSDFIHFVDHFSGTAGEALLSYNASSNVTDLVNIIGGHQAP DFLVKIVGQVDVATDFIV</b>	SEC ID N° 1
ARA2	<b>MSYWSETNTGGDNGGHYAAAPLLDDIAAIQHLYGANLSTRTGDTVYGFNSNTGRDFLSTT SNSQKVIFAAWDAGGNDTDFDFSGYTANQRINLNEKSFSDVGGGLKGNVSIAGVTIENAIG FRQRLIVGNAANNVLKGGAGNDVLFGGGGADELWGGAGKDI FVFSAAASDSAPGASDWIR FQKGIKIDLSFFNKEAQSSDFIHFVDHFSGAAGEALLSYNASNNVTDLVNIIGGHQAPD FLVKIVGQVDVATDFIV</b>	SEC ID N° 2
ARA3	<b>TRTGDTVYGFNSNTGRDFLSTTSNSQKVIFAAWDAGGNDTDFDFSGYTANQRINLNEKSF DVGGGLKGNVSIAGVTIENAIGFRQRLIVGNAANNVLKGGAGNDVLFGGGGADELWGGAG KDI FVFSAAASDSAPGASDWIRDFQKGIKIDLSFFNKEAQSSDFIHFVDHFSGAAGEALL SYNASNNVTDLVNIIGGHQAPDFLVKIVGQVDVATDFIV</b>	SEC ID N° 3
ARA4	<b>TRTGDTVYGFNSNTGRDFLSTTSNSQKVIFAAWDAGGNDTDFDFSGYTANQRINLNEKSF DVGGGLKGNVSIAGVTIENAIGFRQRLIVGNAANNVLKGGAGNDVLFGGGGADELWGGAG KDI FVFSAAASDSAPGASDWIRDFQKGIKIDLSFFNKEAQSSDFIHFVDHFSGAAGEALL SYNASNNVTDLVNIIGGHQAPDFLVKIVGQVDVATDFIV</b>	SEC ID N° 4

10 **EJEMPLO 16.** Apoptosis inducida por MG2327

*MG2327 induce apoptosis sobre mieloma X63 con fragmentación del ADN, involucrando mitocondrias y microtúbulos.*

- 15 Para determinar el tipo de muerte que experimentan las células tumorales, células de mieloma murino P3X63Ag8 ( $2 \times 10^6$ ) fueron tratadas in vitro con  $22 \mu\text{g/mL}$  de MG2327. A diferentes tiempos de tratamiento, las células tratadas 0 no fueron preparadas para su estudio ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión y su ADN genómico fue extraído para desarrollar la técnica del ADN escalera.

- 20 La fragmentación del ADN fue detectada con electroforesis en gel de agarosa. La apoptosis esta frecuentemente acompañada de un rápido corte del ADN celular en múltiplos de 180-200 pb, correspondiendo al espacio internucleosomal. La detección de la fragmentación del ADN se realizó en geles de agarosa al 12% (Soldatenkov, V. A, Prasad, S., Voloshin, Y., and Dritschilo, A 1998. Cell Death Differ. 5:307-12), Fig. 13, donde se observó un incremento significativo en la formación de oligonucleosomas que correlacionaron con los cambios morfológicos observados en cultivo y por microscopía electrónica.

- 25 Los cortes internucleosomales precedieron la aparición de señales morfológicas de apoptosis, cuando las células fueron observadas por microscopía óptica. Además, las microfotografías mostraron orgánulos citoplasmáticos alterados (mitocondria, 2 h) que precedieron la condensación de la cromatina (4 h) y los cortes internucleosomales (6 h).

*MG2327 afecta a los microtúbulos y a la organización ultraestructural de las mitocondrias originando un incremento en la apoptosis de P3X63AgB.*

- 30 Las células no tratadas mostraron una ultraestructura típica de mitocondrias: crestas mitocondriales claramente visibles, y alta densidad de la matriz mitocondrial, distribuidas por todo el citoplasma (Fig. 14A).

En las células tratadas con la preparación MG2327, el tamaño de las mitocondrias se incrementó la densidad de la matriz mitocondrial fue mucho menor, y la morfología de las crestas se encontraba severamente afectadas (Fig. 14B-E). Estas alteraciones ultraestructurales generalmente son un indicativo de la alteración de la función de estos orgánulos.

5 Además, los inventores observaron extensas vacuolizaciones citoplasmáticas, que involucraron a orgánulos tales como el retículo endoplasmático y las mitocondrias, a partir de las dos horas posteriores al tratamiento, (Fig. 14B), y la integridad morfológica del núcleo.

10 A las 6 h de tratamiento se observaron en el núcleo distintos cambios morfológicos (condensación, marginación y fragmentación de la cromatina). En la microfotografía de la fase tardía de la apoptosis (8 h) en P3X63Ag8 tratadas con MG2327 se observó la cromatina compactada (Fig. 14F). En todos los tiempos analizados se conservó la integridad de la membrana.

15 Cabe destacar que las células P3X63Ag8 tratadas durante 2 h con MG2327 presentaron mitocondrias en forma de racimos, que se agruparon hacia un lado de las células (Fig. 14B-E), interpretado como el resultado de la ruptura de los microtúbulos, y el fracaso del transporte mitocondrial a 10 largo de este orgánulo (Schatten, H., and Lewis, M.L. 2001. Acta Astronaut. 49:399-418).

20 En las Figuras 14C y D, también se observaron mitocondrias de mayor tamaño y estructuras condensadas dentro de las mismas, unidas a la membrana interna mitocondrial. Estas estructuras pudieron ser originadas por crestas individuales que parecieron estar fusionadas. MG2327 pudiera inducir apoptosis mediante la liberación del citocromo c al citosol (producto del aumento de tamaño de las mitocondrias), mediada por la apertura de canales en la membrana externa, que trae consigo la activación de caspasas que originan apoptosis (Green, D.R. and Reed, J.e. 1998. Science. 20 28:1309-1312. Review). En ultima instancia, en ausencia del aumento de tamaño de las mitocondrias, el citocromo c almacenado en las crestas intramitocondriales dañadas, pudieran ser total y rápidamente liberadas al interior del citosol, por las uniones creadas entre las crestas y el espacio intermembrana abierto por el proceso de fusión (Scorrano, L., Ashiya, M., Buttler, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, e.A. and Korsmeyer, S.J. 2002. Dev Cell. 2:55-67). El proceso descrito contribuyo significativamente a la amplificación de las señales de apoptosis generadas por MG2327.

**EJEMPLO 17.** Las proteínas p25 y p50 inducen apoptosis.

30 Para saber si las proteínas p25 y p50 pudieran estar involucradas en los eventos apoptóticos descritos para MG2327, estas proteínas fueron incubadas de forma individual con las células P3X63Ag8 en diferentes concentraciones y analizadas por microscopia electrónica. También se observó condensación de la cromatina, daños en las crestas mitocondriales y las estructuras en forma de racimos de las mitocondrias. Estos resultados indican que la inducción de apoptosis por MG2327 esta comprometida con el efecto de estas dos proteínas.

**EJEMPLO 18.** Efecto anti-angiogénico de MG2327 y los polipéptidos anti-proliferativos.

*Formación de estructuras tubulares en matrigel.*

35 Se evaluó la formación de cordones endoteliales por las células endoteliales humanas derivadas de microvasculatura (HMEC) sobre matrigel (Crum R, Szabo S, Folkman J. 1985. Science. 230:1375-8; Vacca, A, Ribatti, D., Presta, M., Minischetti, M., Iurlaro, M, Ria, R, Albin, A, Bussolino, F. and Dammaacco, F. 1999. Blood 93:3064), en presencia de concentraciones no citotóxicas de MG2327 y sus fracciones p25 y p50. Los ensayos se condujeron como ha sido notificado por Sanz y col. (Sanz, L., Pascual, M., Munoz, A, Gonzalez, M.A, Salvador CH, Alvarez-Vallina L. 2002. Microvascular Research 63:335-339). Los resultados consideraron la longitud de las estructuras tubulares formadas y el número de interconexiones entre ellas usando el programa Image-Pro Express 4.5. Estos indicaron una inhibición significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA) de la diferenciación o maduración de las células endoteliales (Fig.15) tras tratamiento con la preparación MG2327 y sus fracciones p25 y p50.

**EJEMPLO 19.** MG2327 tiene efecto indirecto sobre las células proliferantes.

45 *MG2327 protege a ratones BALB/c de implantes de tumores mieloides.*

50 Para analizar la actividad protectora de MG2327 contra implantes de tumores, ratones BALB/c fueron inoculados (Lp.) con 1 mg/ml de este preparado antitumoral con diferentes esquemas de inmunización. Se empleó una dosis por semana durante tres semanas y dos dosis por semana durante tres semanas con intervalos de al menos tres días entre dosis. Un grupo control negativo fue inoculado con PBS. Dos millones de células del mieloma P3X63Ag8 fueron inoculadas Lp. a los grupos experimentales y al grupo control. Después de 150 días de la primera dosis (5 meses Después). Los ratones control negativos murieron en el término de 25 días, mientras el 100 % de los animales tratados de ambos grupos experimentales sobrevivieron sin presencia de tumor (Fig. 16).

**EJEMPLO 20.** El dominio C-terminal de otras serralisinas también tiene efecto citotóxico, sin actividad proteolítica.

5 La cepa ATCC14756 fue cultivada en iguales condiciones que la cepa CMIB4202 según el Ejemplo 2 y sus sobrenadantes de cultivo se procesaron como se describió en el Ejemplo 6. En ambas preparaciones se observaron proteínas a la altura de 50 kDa que eluyeron con 50 mM de fosfato-0,2 M NaCl, pH 8.00. Estas proteínas presentaron actividad enzimática que fue inhibida con 10 mM de EDTA y recobrada con 5  $\mu$ M de Zn<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ambas proteínas se sometieron a digestión química con CNBr y su patrón de corte fue similar, generando fragmentos simi/ares de aproximadamente 25 kDa, correspondientes al C-terminal de la p50, a partir de la metionina interna de la secuencia hasta el final de la molécula.

10 Los fragmentos obtenidos en la digestión se renaturalizaron mediante cambio de tampón por diálisis durante 48 h. La actividad biológica de estos fragmentos se analizó en el ensayo de citotoxicidad descrito en el presente documento usando células HEp.2, las cuales se incubaron durante 72 horas en presencia de los mismos. Los fragmentos sin actividad proteolítica, en presencia de 5 mM de EDTA, producto de la digestión, presentaron actividad citotóxica dependiente de la dosis superior, aproximadamente 2,5 veces más que la de la molécula de p50 completa. Estos fragmentos una vez conocida su secuencias, también es posible obtenerlos mediante síntesis química o por vía recombinante.

**EJEMPLO 21** Combinación de fragmentos de Serralisinas con anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

20 Los fragmentos polipeptídicos obtenidos en los Ejemplos 6 y 20 se conjugaron químicamente con el anticuerpo monoclonal AcM CB/ior-CEA.1 (Tormo B et al. APMIS 97: 1073-1 080, 1989), con sus regiones variables y con el fragmento de anticuerpo obtenido por vía recombinante a partir de la secuencia de este AcM (Diabody) (patente WO 03/093315). Las biomoléculas conjugadas fueron ensayadas sobre las líneas celulares de tumores humanos LoVo (ATCC CCL-229), AsPC-1 (ATCC CRL-1682) y LS 174T (ATCC CL-188), todas las que expresan CEA en cultivo, realizado un ensayo antiproliferativo similar al descrito en el Ejemplo 3. Los fragmentos conjugados se usaron a concentraciones citotóxicas equivalentes a la de los fragmentos no conjugados, observándose una respuesta dependiente de la dosis, mientras que a concentraciones no citotóxicas, no se observó respuesta anti-proliferativa, pero se evidenció que a pesar de la ausencia de respuesta, los fragmentos conjugados se unen a las células cuando se empleó el procedimiento de reconocimiento del CEA humano asociado a células mediante ELISA de células e inmunofluorescencia indirecta, (patente WO 03/093315). Estos resultados demuestran que los conjugados descritos en el presente documento se pueden usar en la terapia y el diagnóstico del cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE CONTIENE FRAGMENTOS POLIPEPTÍDICOS DE SERRALISINAS

130> María del Carmen

5 <140>

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

10 <211> 258

<212> PRT

<213> Serratia marcescens

<220>

<221> PEPTIDE

15 <222> (1)..(258)

<223> Polipéptido ARA1: antiproliferativo, apoptótico, antiangiogénico y protector contra enfermedades relacionadas con la proliferación celular y la angiogénesis. Secuencia del C-terminal del SERMA. Serralisina

<400> 1

```

Met Ser Tyr Trp Ser Glu Thr Asn Thr Gly Gly Asp Asn Gly Gly His
  1           5           10           15

Tyr Ala Ala Ala Pro Leu Leu Asp Asp Ile Ala Ala Ile Gln His Leu
      20           25           30

Tyr Gly Ala Asn Pro Ser Thr Arg Thr Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe
      35           40           45

Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu Ser Thr Thr Ser Asn Ser Gln
      50           55           60

Lys Val Ile Phe Ala Ala Trp Asp Ala Gly Gly Asn Asp Thr Phe Asp
      65           70           75           80

Phe Ser Gly Tyr Thr Ala Asn Gln Arg Ile Asn Leu Asn Glu Lys Ser

```

20

ES 2 389 126 T3

85 90 95

Phe Ser Asp Val Gly Gly Leu Lys Gly Asn Val Ser Ile Ala Ala Gly  
 100 105 110

Val Thr Ile Glu Asn Ala Ile Gly Gly Ser Gly Asn Asp Val Ile Val  
 115 120 125

Gly Asn Ala Ala Asn Asn Val Leu Lys Gly Gly Ala Gly Asn Asp Val  
 130 135 140

Leu Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Glu Leu Trp Gly Gly Ala Gly Lys  
 145 150 155 160

Asp Ile Phe Val Phe Ser Ala Ala Ser Asp Ser Ala Pro Gly Ala Ser  
 165 170 175

Asp Trp Ile Arg Asp Phe Gln Lys Gly Ile Asp Lys Ile Asp Leu Ser  
 180 185 190

Phe Phe Asn Lys Glu Ala Asn Ser Ser Asp Phe Ile His Phe Val Asp  
 195 200 205

His Phe Ser Gly Thr Ala Gly Glu Ala Leu Leu Ser Tyr Asn Ala Ser  
 210 215 220

Ser Asn Val Thr Asp Leu Ser Val Asn Ile Gly Gly His Gln Ala Pro  
 225 230 235 240

Asp Phe Leu Val Lys Ile Val Gly Gln Val Asp Val Ala Thr Asp Phe  
 245 250 255

Ile Val

<210> 2

<211> 257

5 <212> PRT

<213> *Serratia marcescens*

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(257)

10 <223> Polipéptido ARA2: antiproliferativo, apoptótico, antiangiogénico y protector contra enfermedades relacionadas con la proliferación celular y la angiogénesis. Secuencia del C-terminal del SERSP. Serralisina

<400> 2

ES 2 389 126 T3

Met Ser Tyr Trp Ser Glu Thr Asn Thr Gly Gly Asp Asn Gly Gly His  
 1 5 10 15  
 Tyr Ala Ala Ala Pro Leu Leu Asp Asp Ile Ala Ala Ile Gln His Leu  
 20 25 30  
 Tyr Gly Ala Asn Leu Ser Thr Arg Thr Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe  
 35 40 45  
 Asn Ser Asn Thr Gly Arg Asp Phe Leu Ser Thr Thr Ser Asn Ser Gln  
 50 55 60  
 Lys Val Ile Phe Ala Ala Trp Asp Ala Gly Gly Asn Asp Thr Phe Asp  
 65 70 75 80  
 Phe Ser Gly Tyr Thr Ala Asn Gln Arg Ile Asn Leu Asn Glu Lys Ser  
 85 90 95  
 Phe Ser Asp Val Gly Gly Leu Lys Gly Asn Val Ser Ile Ala Ala Gly  
 100 105 110  
 Val Thr Ile Glu Asn Ala Ile Gly Phe Arg Gln Arg Leu Ile Val Gly  
 115 120 125  
 Asn Ala Ala Asn Asn Val Leu Lys Gly Gly Ala Gly Asn Asp Val Leu  
 130 135 140  
 Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Glu Leu Trp Gly Gly Ala Gly Lys Asp  
 145 150 155 160  
 Ile Phe Val Phe Ser Ala Ala Ser Asp Ser Ala Pro Gly Ala Ser Asp  
 165 170 175  
 Trp Ile Arg Asp Phe Gln Lys Gly Ile Asp Lys Ile Asp Leu Ser Phe  
 180 185 190  
 Phe Asn Lys Glu Ala Gln Ser Ser Asp Phe Ile His Phe Val Asp His  
 195 200 205  
 Phe Ser Gly Ala Ala Gly Glu Ala Leu Leu Ser Tyr Asn Ala Ser Asn  
 210 215 220  
 Asn Val Thr Asp Leu Ser Val Asn Ile Gly Gly His Gln Ala Pro Asp  
 225 230 235 240  
 Phe Leu Val Lys Ile Val Gly Gln Val Asp Val Ala Thr Asp Phe Ile  
 245 250 255

Val

<210> 3

<211> 219

5 <212> PRT

<213> *Serratia marcescens*

ES 2 389 126 T3

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(219)

5 <223>: Polipéptido ARA3: antiproliferativo, apoptótico, antiangiogénico y protector contra enfermedades relacionadas con la proliferación celular y la angiogénesis. Secuencia del C-terminal del SERSP. Serralisina

<400> 3

Thr Arg Thr Gly Asp Thr Val Tyr Gly Phe Asn Ser Asn Thr Gly Arg  
 1 5 10 15

Asp Phe Leu Ser Thr Thr Ser Asn Ser Gln Lys Val Ile Phe Ala Ala  
 20 25 30

Trp Asp Ala Gly Gly Asn Asp Thr Phe Asp Phe Ser Gly Tyr Thr Ala  
 35 40 45

Asn Gln Arg Ile Asn Leu Asn Glu Lys Ser Phe Ser Asp Val Gly Gly  
 50 55 60

Leu Lys Gly Asn Val Ser Ile Ala Ala Gly Val Thr Ile Glu Asn Ala  
 65 70 75 80

Ile Gly Phe Arg Gln Arg Leu Ile Val Gly Asn Ala Ala Asn Asn Val  
 85 90 95

Leu Lys Gly Gly Ala Gly Asn Asp Val Leu Phe Gly Gly Gly Gly Ala  
 100 105 110

Asp Glu Leu Trp Gly Gly Ala Gly Lys Asp Ile Phe Val Phe Ser Ala  
 115 120 125

Ala Ser Asp Ser Ala Pro Gly Ala Ser Asp Trp Ile Arg Asp Phe Gln  
 130 135 140

Lys Gly Ile Asp Lys Ile Asp Leu Ser Phe Phe Asn Lys Glu Ala Gln  
 145 150 155 160

Ser Ser Asp Phe Ile His Phe Val Asp His Phe Ser Gly Ala Ala Gly  
 165 170 175

Glu Ala Leu Leu Ser Tyr Asn Ala Ser Asn Asn Val Thr Asp Leu Ser  
 180 185 190

Val Asn Ile Gly Gly His Gln Ala Pro Asp Phe Leu Val Lys Ile Val  
 195 200 205

Gly Gln Val Asp Val Ala Thr Asp Phe Ile Val  
 210 215

10 <210> 4

<211> 220

<212> PRT

<213> Serratia marcescens

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(220)

5 <223> Polipéptido ARA4: antiproliferativo, apoptótico, antiangiogénico y protector contra enfermedades relacionadas con la proliferación celular y la angiogénesis. Secuencia del C-terminal del SERMA. Serralisina

<400> 4

Thr	Arg	Thr	Gly	Asp	Thr	Val	Tyr	Gly	Phe	Asn	Ser	Asn	Thr	Gly	Arg
1				5				10						15	
Asp	Phe	Leu	Ser	Thr	Thr	Ser	Asn	Ser	Gln	Lys	Val	Ile	Phe	Ala	Ala
			20					25						30	

ES 2 389 126 T3

Trp Asp Ala Gly Gly Asn Asp Thr Phe Asp Phe Ser Gly Tyr Thr Ala  
35 40 45

Asn Gln Arg Ile Asn Leu Asn Glu Lys Ser Phe Ser Asp Val Gly Gly  
50 55 60

Leu Lys Gly Asn Val Ser Ile Ala Ala Gly Val Thr Ile Glu Asn Ala  
65 70 75 80

Ile Gly Gly Ser Gly Asn Asp Val Ile Val Gly Asn Ala Ala Asn Asn  
85 90 95

Val Leu Lys Gly Gly Ala Gly Asn Asp Val Leu Phe Gly Gly Gly Gly  
100 105 110

Ala Asp Glu Leu Trp Gly Gly Ala Gly Lys Asp Ile Phe Val Phe Ser  
115 120 125

Ala Ala Ser Asp Ser Ala Pro Gly Ala Ser Asp Trp Ile Arg Asp Phe  
130 135 140

Gln Lys Gly Ile Asp Lys Ile Asp Leu Ser Phe Phe Asn Lys Glu Ala  
145 150 155 160

Asn Ser Ser Asp Phe Ile His Phe Val Asp His Phe Ser Gly Thr Ala  
165 170 175

Gly Glu Ala Leu Leu Ser Tyr Asn Ala Ser Ser Asn Val Thr Asp Leu  
180 185 190

Ser Val Asn Ile Gly Gly His Gln Ala Pro Asp Phe Leu Val Lys Ile  
195 200 205

Val Gly Gln Val Asp Val Ala Thr Asp Phe Ile Val  
210 215 220

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

5 <213> *Serratia marcescens*

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(5)

<223> Secuencia de Serralisinas

10 <400> 5

ES 2 389 126 T3

Ala Gln Glu Asn Ser  
1 5

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

5 <213> *Serratia marcescens*

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(4)

<223> Secuencia de Serralisinas

10 <400> 6

Thr Phe Ser Phe  
1

<210> 7

<211> 3

<212> PRT

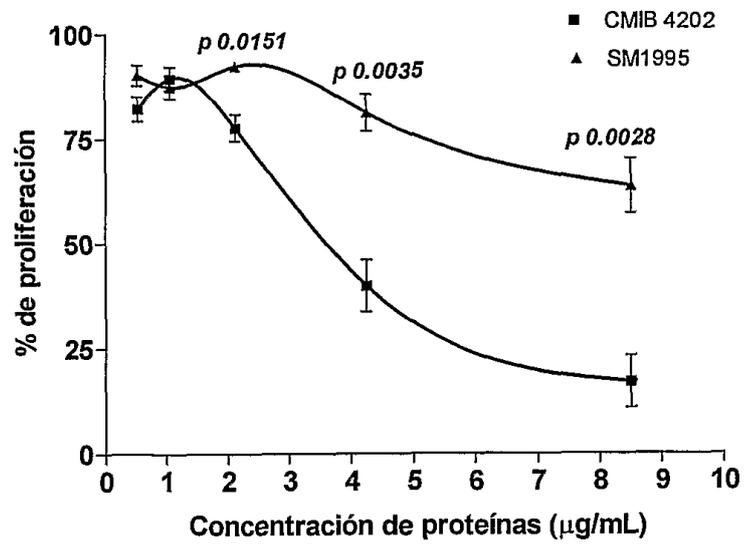
15 <213> *Serratia marcescens*

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica **caracterizada porque** contiene uno o varios fragmentos de serralisina que tienen la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, SEC ID N° 14, SEC ID N° 15 y SEC ID N° 16, para uso en la inducción de efectos anti-tumorales en el organismo receptor y dichos efectos antitumorales son, terapéuticos o preventivos.
- 10 2. Una composición farmacéutica para uso acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichos fragmentos de serralisina se obtienen de sobrenadantes de cultivos celulares mediante manipulación genética o mediante síntesis química.
3. Una composición para uso acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en la que dichos fragmentos aparecen en la composición solos, conjugados o mezclados,
4. Una composición para uso acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dichos fragmentos de serralisina son parte de moléculas quiméricas o híbridas obtenidas mediante manipulación genética o mediante síntesis química.
- 15 5. Fragmentos de serralisina seleccionados del grupo constituido por las SEC ID N° 1-4 y las SEC ID N° 10-16 para uso en el tratamiento de enfermedades proliferativas.
6. Fragmentos de serralisina para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en los que dichos fragmentos son parte de una composición que contiene anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, hebras de ácido nucleico o moléculas de hidratos de carbono o moléculas de proteínas y dichos fragmentos están solos, conjugados o mezclados.
- 20 7. Fragmentos de serralisina para usar de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, solos o en combinación, que se caracterizan porque forman parte de dicha composición como agregados moleculares, solos, en combinación entre ellos o en combinación con otras moléculas de hidratos de carbono o moléculas de proteínas.
- 25 8. Un procedimiento de diagnóstico in vitro para patologías relacionadas con la sobreexpresión de receptores para factores de crecimiento y enfermedades inflamatorias que comprenden el uso de fragmentos de serralisina de acuerdo con las reivindicaciones 5 a 7, solos o en combinación,
9. Un procedimiento de detección selectiva para patologías relacionadas con la sobreexpresión de receptores para factores de crecimiento y enfermedades inflamatorias, que comprende el uso de fragmentos de serralisina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, solos o en combinación,
- 30 10. Una composición para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque además contiene una o más prodigiosinas, en la que dichas prodigiosinas potencian la actividad antitumoral de la composición mencionada,
11. Una composición para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 10 para usar en el tratamiento de estados patológicos relacionados con la angiogénesis, células en proliferación y sistema inmunitario.
- 35 12. Una composición para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 10 para usar en el tratamiento de estados patológicos que se pueden tratar mediante inducción de factores antiproliferativos, apoptóticos, antiangiogénicos, inmunomoduladores o de diferenciación/regulación.

Figura 1

**A**



**B**

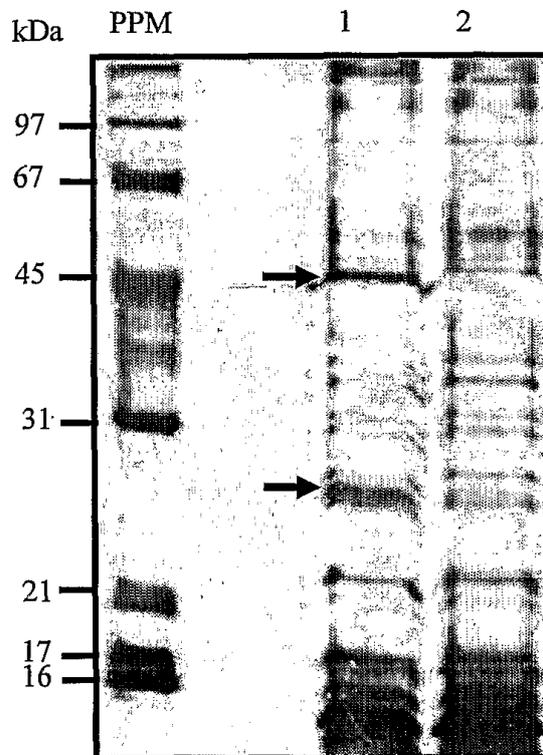


Figura 2

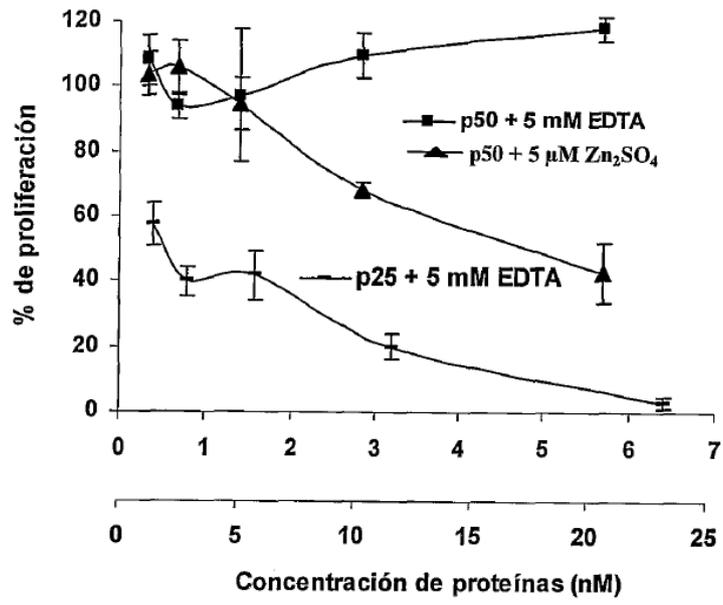


Figura 3

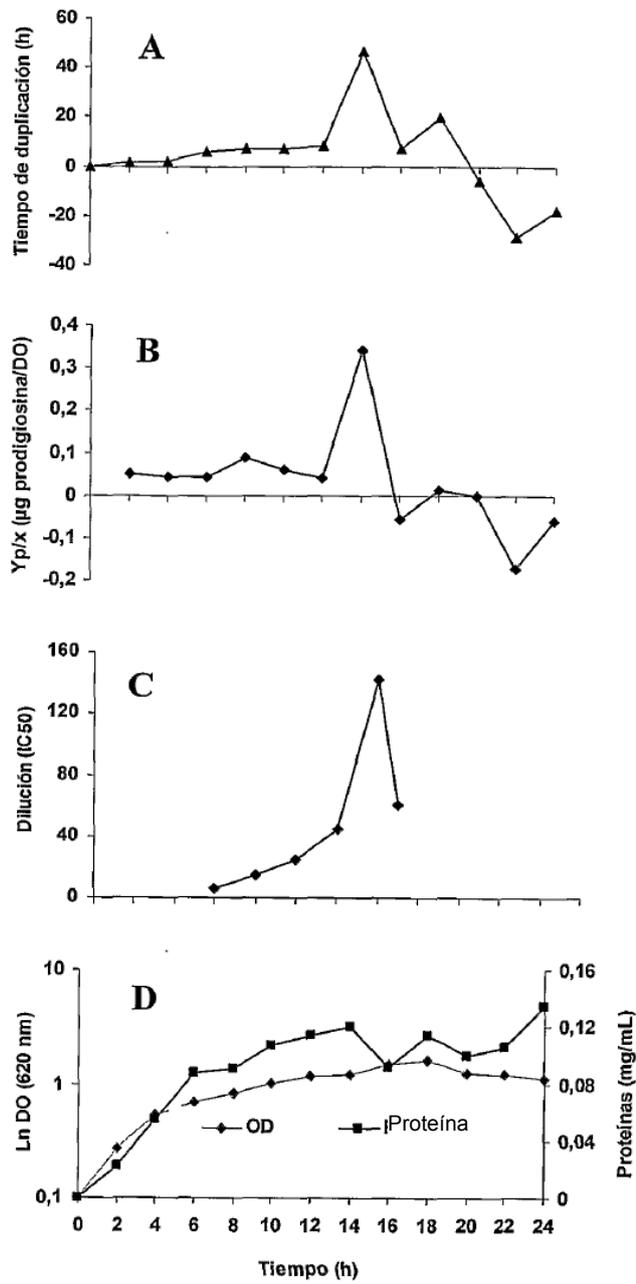


Figura 4

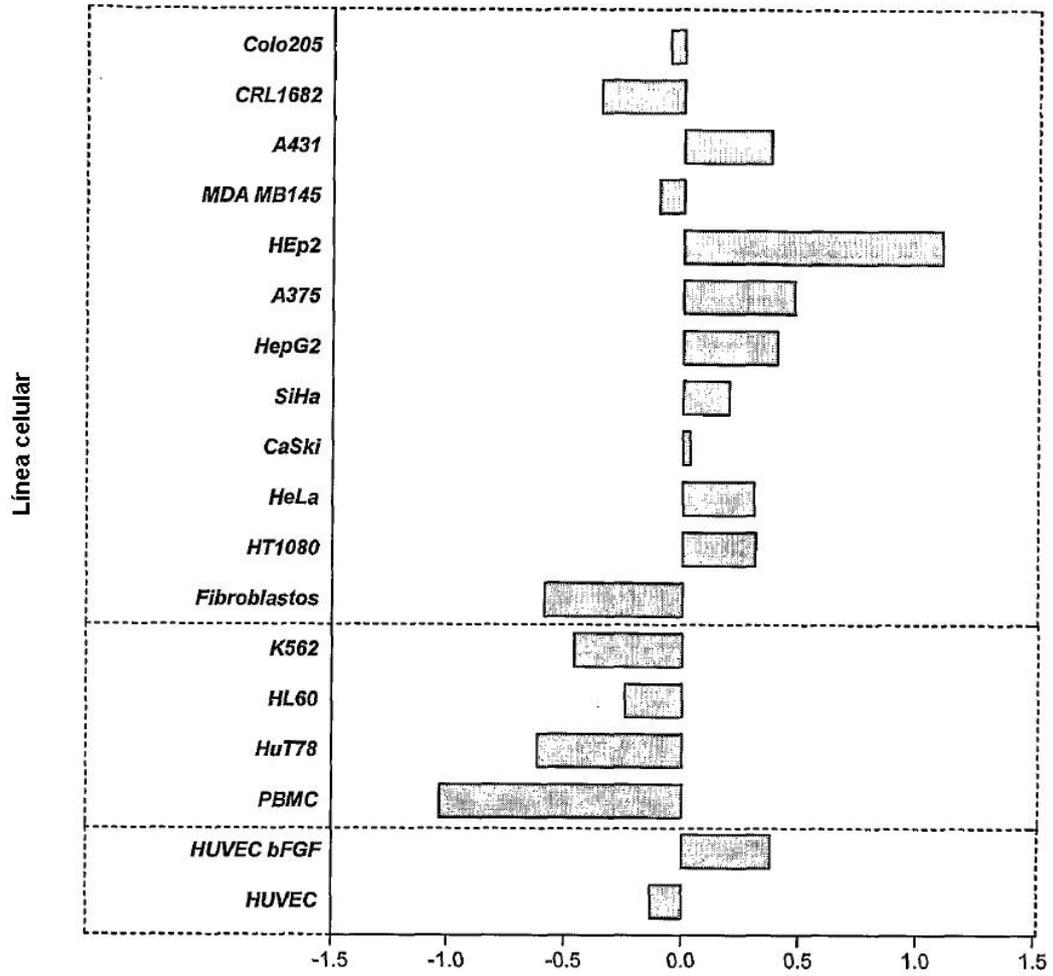


Figura 5

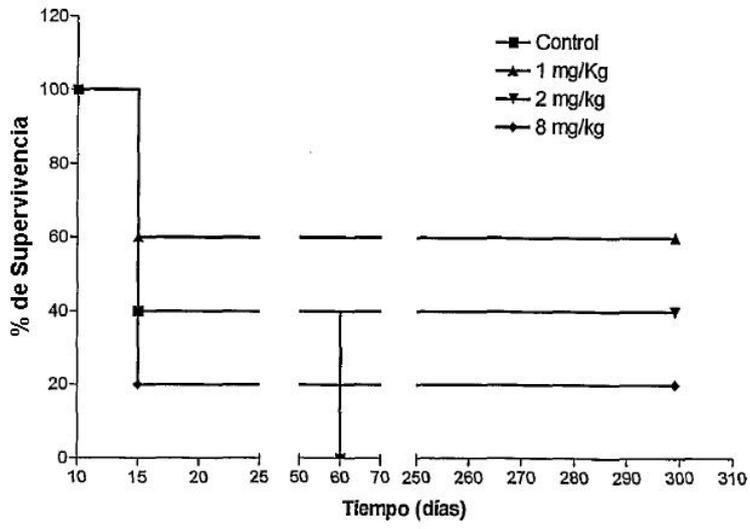


Fig. 6

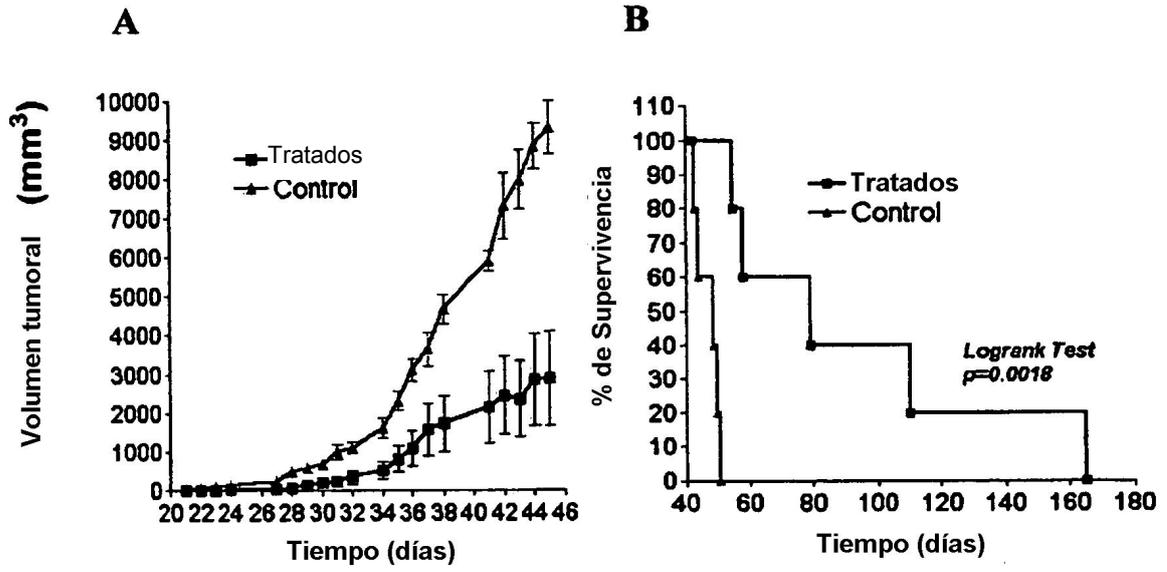
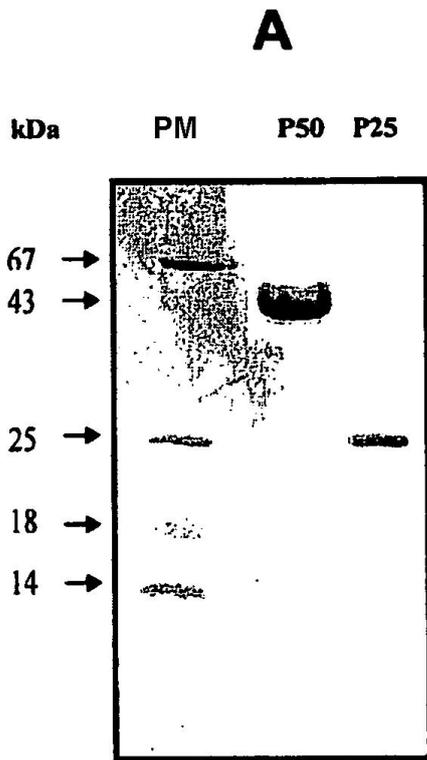


Fig. 7

A



**B**

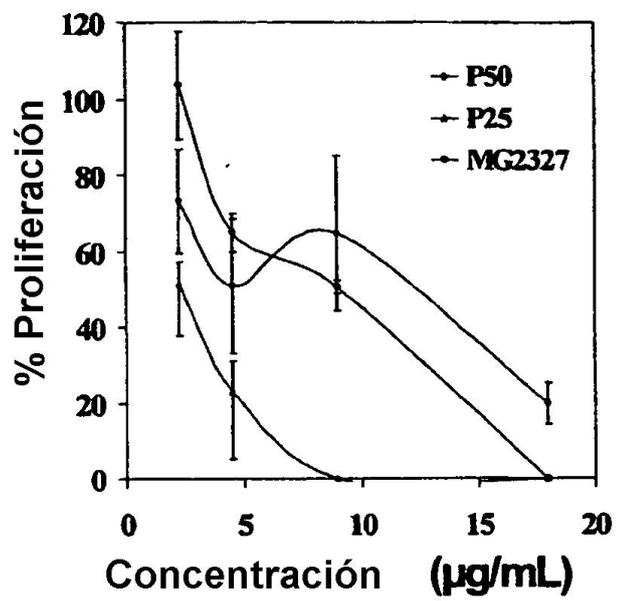


Fig. 8

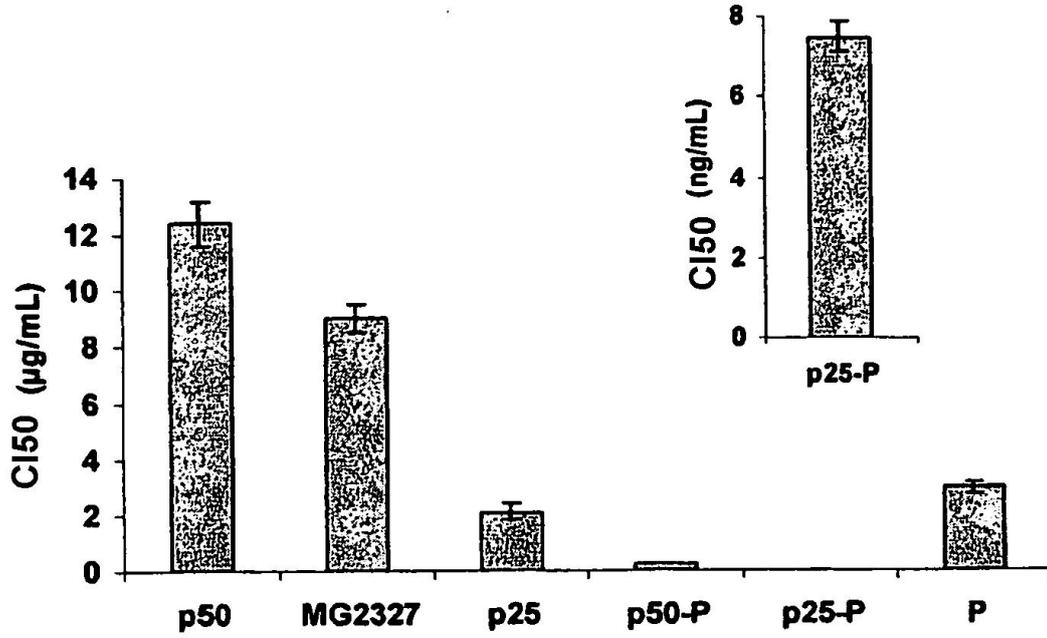
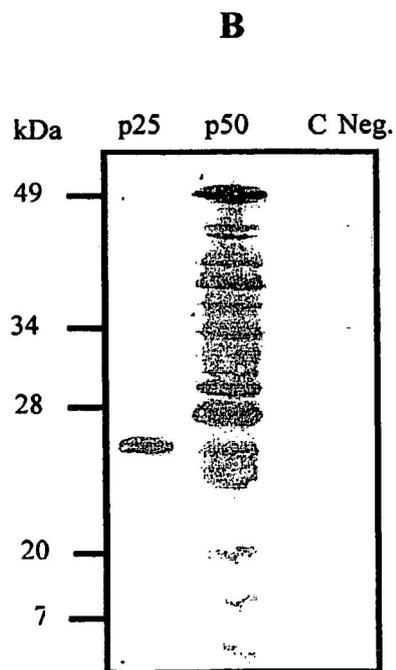
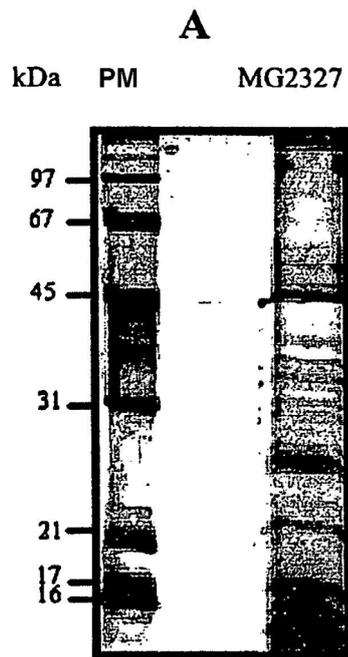
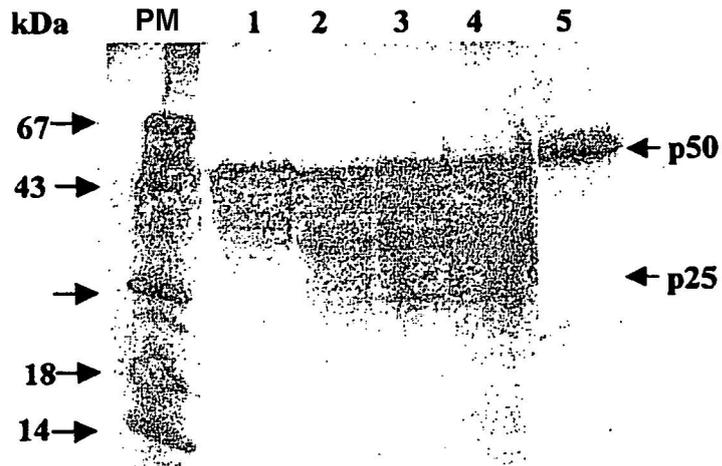


Fig. 9



**Fig 10**

**A**



**B**

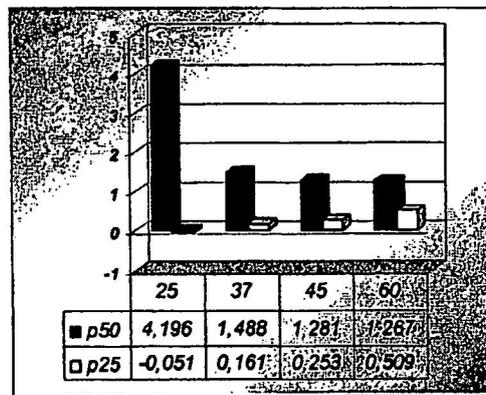
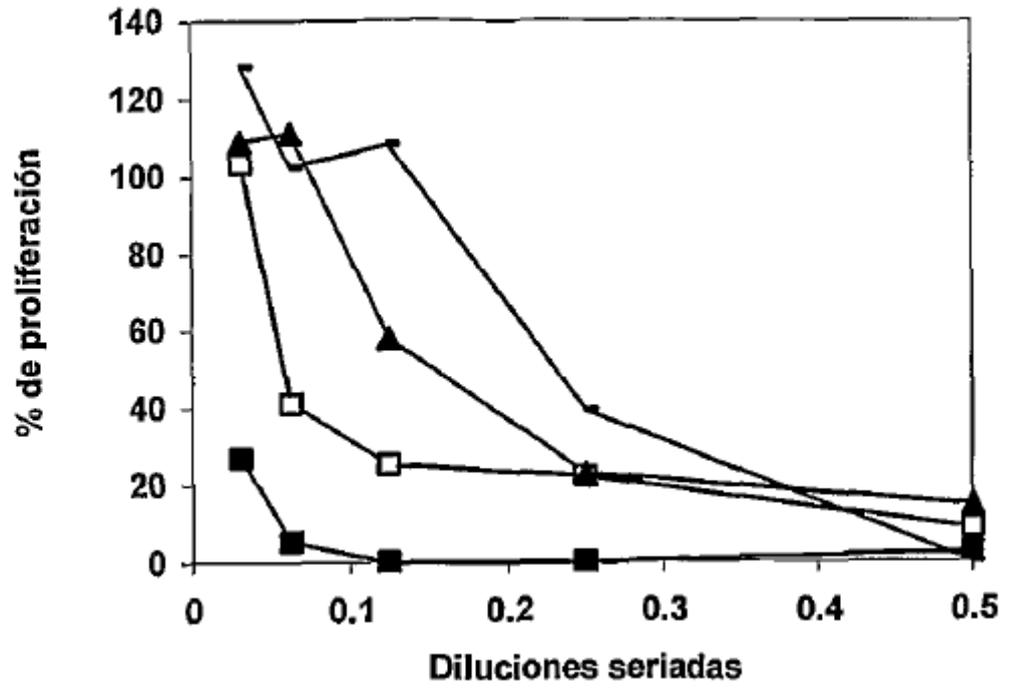
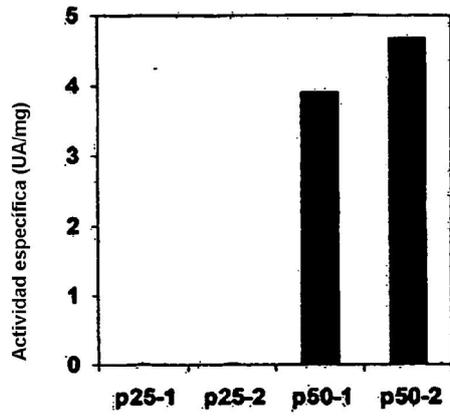


FIG. 11



**Fig 12**

**A**



**B**

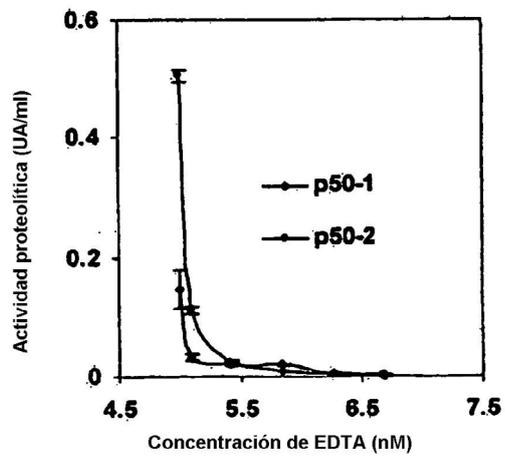
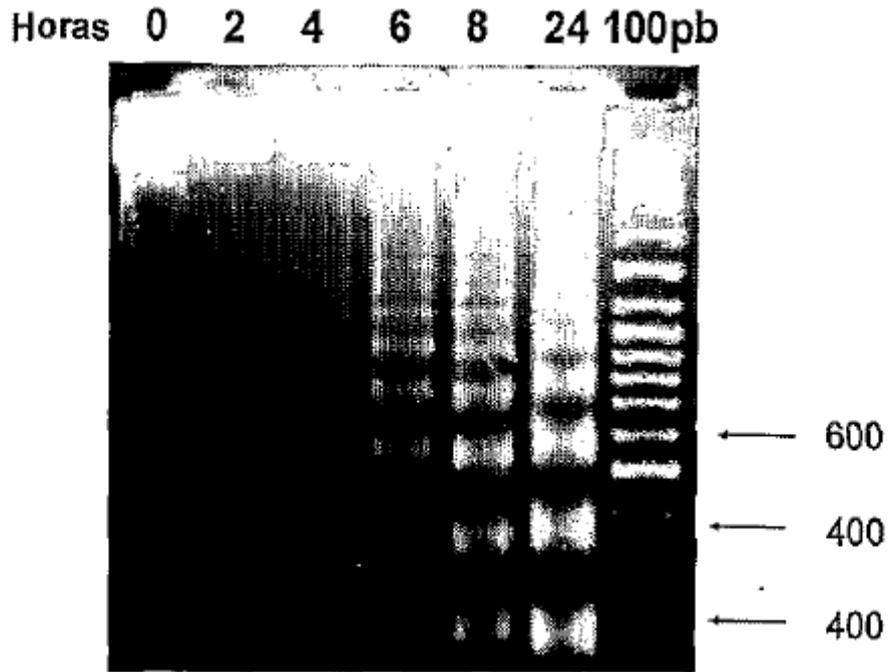


FIG. 13



**Fig 14**

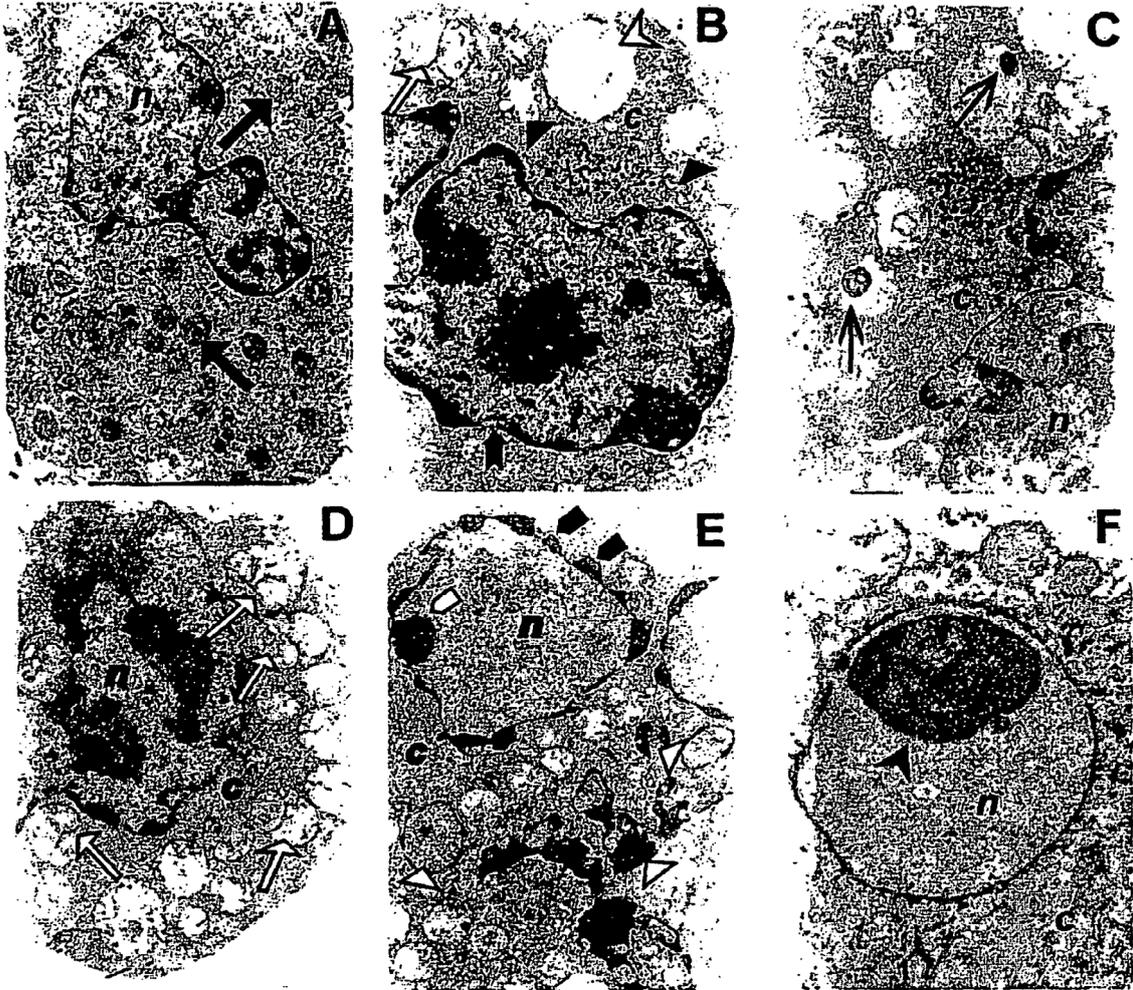


FIG. 15

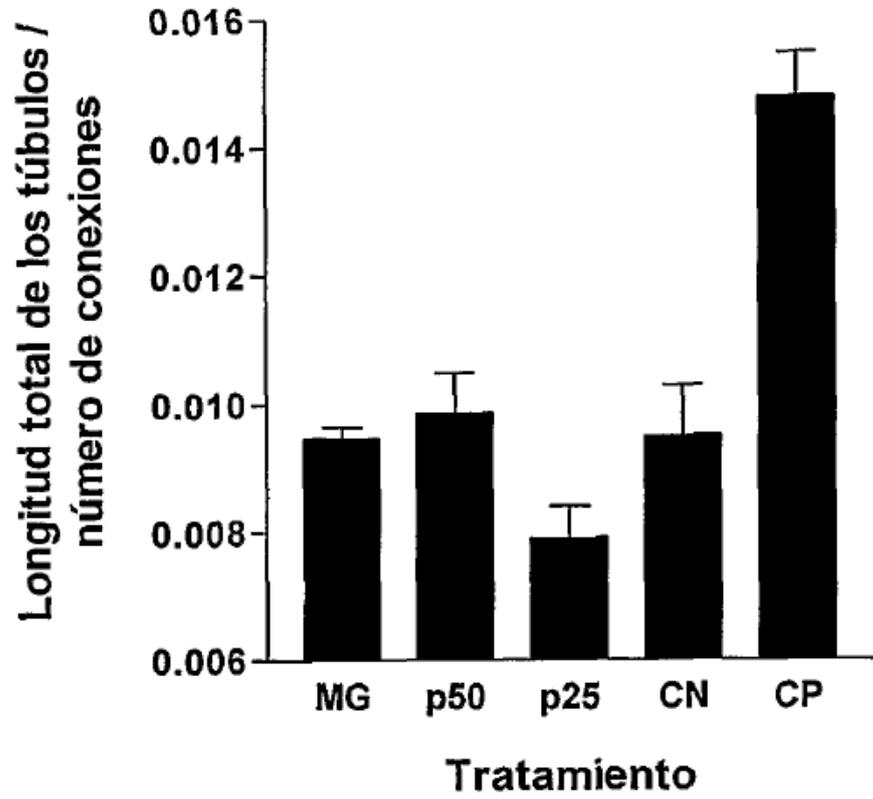


FIG. 16

