

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 998**

51 Int. Cl.:

C12N 9/22 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2000 E 08168000 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 2165605**

54 Título: **Uso de una ribonucleasa de la familia T2 que tiene actividad de unión a actina para inhibir y/o invertir la proliferación**

30 Prioridad:

30.08.1999 US 385411

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.03.2013

73 Titular/es:

**YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY
OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM
LTD. (100.0%)**

**Hi Tech Park, The Edmond J. Safra Campus, The
Hebrew University of Jerusalem, Givat Ram
POX 39135
91390 JERUSALEM, IL**

72 Inventor/es:

**ROIZ, LEVAVA;
SCHWARTZ, BETTY;
SMIRNOFF, PATRICIA y
SHOSEYOV, ODED**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 396 998 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de una ribonucleasa de la familia T2 que tiene actividad de unión a actina para inhibir y/o invertir la proliferación

La presente invención se refiere a una ribonucleasa de la familia T2 para su uso en la prevención del desarrollo de tumores de acuerdo con la reivindicación 1, una ribonucleasa de la familia T2 para su uso en la inhibición de angiogénesis de un tumor de acuerdo con la reivindicación 8.

La presente divulgación se refiere al uso de una ribonucleasa de la familia T2 o un polinucleótido que la codifica para prevenir, inhibir y/o invertir la proliferación, la colonización, la diferenciación y/o el desarrollo de células que proliferan de forma anómala en un sujeto. La presente divulgación se refiere además a composiciones farmacéuticas que contienen, como principio activo, una ribonucleasa de la familia T2 o un polinucleótido que la codifica para tratar enfermedades o trastornos proliferativos en general y cáncer en particular.

Existe un interés continuado, tanto dentro de la comunidad médica como entre la población general, en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades y trastornos proliferativos celulares tales como cáncer.

Los agentes que presentan propiedades antiproliferativas, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo frente a células de mamífero pueden potencialmente usarse como fármaco antineoplásicos. Como tales, estos agentes se buscan ampliamente desde fuentes tanto naturales como sintéticas.

Las RIBASAS son ribonucleasas (RNAsas) que presentan una actividad biológica que es distinta de su capacidad para degradar ARN. Se sabe que las RIBASAS y sus homólogos estructurales efectúan un gran número de reacciones celulares (Rybak, M. y col., 1991, J. Biol. Chem. 266: 21202-21207; Schein, C. H. 1997 Nature Biotechnol. 15: 529-536). Se cree que EDN y ECP, dos proteínas principales halladas en los gránulos secretores de eosinófilos citotóxicos (miembros de la familia de RNasa A) participan en la respuesta inmune. Las S-RNAsas estilares de plantas autoincompatibles (miembros de la familia de RNasa T2), detienen el crecimiento del tubo polínico y de este modo evitan la fertilización. La RC-RNasa, producida por oocitos de rana toro, inhibe, *in vitro*, el crecimiento de células tumorales tales como las líneas celulares de leucemia P388 y L1210 y es eficaz para la destrucción *in vivo* de células de sarcoma 180, Erlich y líquido ascítico Mep II (Chang, C-F. y col 1988, J. Mol Biol 283: 231-244). Algunas RNAsas presentan actividad ribonucleasa limitada, un ejemplo de la cual incluye angiogeninas que estimulan la formación de vasos sanguíneos (Fett, J. W. 1985, Biochemistry 24: 5480-5486).

Los organismos vivos usan RNAsas extracelulares para defensa contra patógenos y células tumorales. Por ejemplo, se secreta ECP en respuesta a ataque de parásitos (Newton, DL. 1992, J. Biol. Chem. 267: 19572-19578) y presenta actividad antibacteriana y antiviral. Esta actividad también se presenta por Cinc- α_2 -glicoproteína (Zn α_2 gp), una RNasa presente en la mayoría de los fluidos corporales humanos incluyendo sangre, plasma seminal, leche materna, fluido sinovial, saliva, orina y sudor (Lei G, y col., 1998, Arch Biochem Biophys. 15 Jul; 355(2): 160-4).

Se desconoce el mecanismo específico por el que las RNAsas extracelulares actúan en reacciones celulares.

La principal barrera para la actividad citotóxica de algunas RNAsas es la membrana celular. Se ha descubierto que ECP forma canales en membranas tanto artificiales como celulares. Supuestamente, ECP liberada de la membrana granular junto con EDN (RNasa eosinófila, que es responsable de la destrucción de células de Purkinje cerebelares) transfiere EDN al espacio intercelular. La entrada de la toxina fúngica α -sarcina (un miembro de la familia de RNasa A) en células diana depende de infección viral que permeabiliza la membrana celular (Rybak, M. y col., 1991, J. Biol. Chem. 266: 21202-21207). También es posible que las RNAsas entren en la célula mediante endocitosis. Cuando se usaron los fármacos que alteran el Golgi ácido retinoico o monensina para suministrar de forma artificial BS-RNasa a las células, la citotoxicidad aumentó drásticamente (Wu Y, y col., 1995, J Biol Chem. 270(29): 17476-81).

Puede usarse la citotoxicidad de las RNAsas para fines terapéuticos. La RNasa humana L se activa por interferón e inhibe el crecimiento viral. La expresión del gen para RNasa L humana junto con el de una 2'5'-A sintetasa en plantas del tabaco es suficiente para proteger a las plantas de virus del mosaico del pepino y para evitar la replicación del virus de la patata Y. El virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) induce bloqueo en las rutas antivirales de RNasa L (Schein, C. H. 1997 Nature Biotechnol. 15: 529-536.). Las RNAsas pueden fusionarse con anticuerpos de proteína de membrana específicos para crear inmunotoxinas. Por ejemplo, la fusión de RNasa con anticuerpos para el receptor de transferrina o para el antígeno de linfocitos T CD5 conduce a la inhibición de la síntesis proteica en células tumorales que portan un receptor específico para cada una de las toxinas anteriores (Rybak, M. y col., 1991, J. Biol. Chem. 266: 21202-21207; Newton DL, y col., 1998, Biochemistry 14; 37(15): 5173-83). Puesto que las RNAsas son menos tóxicas para animales, estas pueden tener menos efectos secundarios indeseables que las inmunotoxinas usadas en la actualidad.

La citotoxicidad de las ribonucleasas citotóxicas parece estar relacionada inversamente con la fuerza de la interacción entre un inhibidor de ribonucleasa (RI) y la RNasa. El inhibidor de ribonucleasa (RI) es una molécula de origen natural hallada dentro de células de las vértebras que sirve para proteger estas células de los efectos potencialmente letales de las ribonucleasas. El inhibidor de ribonucleasa es una proteína citosólica de 50 kDa que se une a RNAsas con diversa afinidad. Por ejemplo, el RI se une a miembros de la superfamilia de la ribonucleasa

pancreática bovina A (RNasa A) de ribonucleasas con constantes de inhibición que abarcan diez órdenes de magnitud, con K_i que varían de 10^{-6} a 10^{-16} M.

A-RNasas

5 La ONCONASA, como RNasa A y BS-RNasa, es un miembro de la superfamilia de RNasa A. Los miembros de la superfamilia de RNasa A comparten aproximadamente el 30 % de identidad en secuencias de aminoácidos. La mayoría de los restos no conservados se localizan en bucles superficiales y parecen desempeñar un papel significativo en la actividad biológica de cada RNasa. La ONCONASA se aisló de oocitos y embriones tempranos de rana Leopardo (*Rana pipiens*). Tiene efecto antitumoral en una diversidad de tumores sólidos, tanto *in situ* como *in vivo* (Mikulski S. M., y col., 1990 J. Natl. Cancer 17; 82(2): 151-3). También se ha descubierto que la ONCONASA inhibe específicamente la replicación de VIH-1 en células de leucemia H9 infectadas a concentración no citotóxica (Youle R. J., y col., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. 21; 91(13): 6012-6).

15 Aunque la actividad RNasa de ONCONASA es relativamente baja, se acepta que las actividades enzimáticas y citotóxicas de la misma están asociadas en cierto grado. Se cree que la estructura terciaria de las A-RNasas diferencia entre tipos citotóxico y no citotóxico. Por ejemplo, se cree que las diferencias entre la estructura terciaria de onconasa y RNasa A son responsables de la citotoxicidad aumentada observada para ONCONASA. La ONCONASA, a diferencia de RNasa A, contiene un resto Glu 1 N terminal bloqueado (piroglutamato) es esencial para la actividades tanto enzimáticas como citotóxicas. Esta estructura única permite a la ONCONASA permear en células diana (Boix E., y col., 1996, J. Mol. Biol. 19: 257(5): 992-1007). Además, en la ONCONASA el resto Lys9 reemplaza el resto Gln11 de RNasa A, que se cree que efectúa la estructura del sitio activo. Además, las diferencias en la secuencia de aminoácidos de la estructura primaria entre ONCONASA y RNasa A provocan cambios topológicos en la periferia del sitio activo que efectúan la especificidad del mismo (Mosimann S. C., y col., 1992, Proteins 14(3): 392-400).

25 Las diferencias de citotoxicidad entre las A-RNasas también se atribuyen a su capacidad para unirse a RI. La ribonucleasa seminal bovina (BS-RNasa) es el 80 % idéntica en su secuencia de aminoácidos a RNasa A, pero a diferencia de otros miembros de la superfamilia de RNasa A, la BS-RNasa existe en forma dimérica. Se ha mostrado que la estructura cuaternaria de BS-RNasa evita la unión con RI, permitiendo de este modo que la enzima conserve su actividad ribonucleolítica en presencia de RI (Kim y col., 1995, J. Biol. Chem. 270 N° 52: 31097-31102). La ONCONASA, que comparte un alto grado de homología con RNasa A, es resistente a unión con RI. El complejo RI-ONCONASA tiene una K_d al menos cien millones de veces menor que la del complejo RI-RNasa A. La menor afinidad de unión de ONCONASA por RI evita la inhibición eficaz de la actividad ribonucleolítica y podría explicar por qué la ONCONASA es citotóxica a concentraciones bajas mientras que RNasa A no.

35 Se ha sugerido que la unión con el receptor de superficie celular es la primera etapa en la citotoxicidad de ONCONASA. No se sabe nada acerca de la naturaleza de los receptores de ONCONASA en superficies celulares de mamífero. La ONCONASA puede unirse a carbohidratos de la superficie celular como en el caso de ricina, o puede unirse a receptores originalmente desarrollados para moléculas importadas fisiológicamente como hormonas polipeptídicas (Wu Y., y col., 1993, J. Biol. Chem. 15; 268(14): 10686-93). En ratones, la ONCONASA se eliminó de los riñones a una velocidad 50-100 veces más lenta que RNasa A. La menor velocidad de eliminación de ONCONASA se explica como resultado de su mayor capacidad para unirse a las células tubulares y/o por su resistencia a degradación proteolítica. La fuerte retención de ONCONASA en los riñones podría tener implicaciones clínicas (Vasandani V. M., y col., 1996, Cancer Res. 15; 56(18): 4180-6). La ONCONASA también puede unirse a receptores de EDN de células de Purkinje (Mosimann S. C., y col., 1996, J. Mol. Biol. 26; 260(4): 540-52). La especificidad de ONCONASA también se expresa en su preferencia de ARNt. En lisado de reticulocitos de conejo y en oocitos de *Xenopus* se descubrió que la ONCONASA inhibe la síntesis proteica mediante degradación de ARNt, en lugar de ARNr o ARNm. Por el contrario, la RNasa A degrada principalmente ARNr y ARNm (Lin J. J., y col., 45 1994, Biochem. Biophys. Res. Commun. 14; 204(1): 156-62).

El tratamiento de cultivos tisulares susceptibles con ONCONASA da como resultado la acumulación de células detenidas en la fase G 1 del ciclo celular, que tienen nivel muy bajo de contenidos de ARN (Mosimann S. C., y col., 1992, Proteins 14(3): 392-400). En células de glioma la ONCONASA inhibió síntesis proteica sin una reducción significativa de la densidad celular, lo que muestra que la ONCONASA también es citotóxica para células además de ser citostática (Wu Y., y col., 1993, J. Biol. Chem. 15; 268(14): 10686-93). La ONCONASA, combinada con agentes quimioterapéuticos, puede superar la resistencia a múltiples fármacos. El tratamiento con vincristina y ONCONASA aumentó el tiempo de supervivencia medio (MST) de ratones que portaban tumores resistentes a vincristina hasta 66 días, en comparación con los 44 días en ratones tratados con vincristina solamente (Schein, C. H., 1997, Nature Biotechnol. 15: 529-536). Además, algunos agentes quimioterapéuticos pueden actuar en sinergia con ONCONASA. En líneas celulares tumorales de adenocarcinoma pancreático humano y carcinoma de pulmón humano tratadas con una combinación de ONCONASA y tamoxifeno (anti-estrógeno), trifluoroperazina (Estelazina, inhibidor de calmodulina) o lovastatina (inhibidor de 3-hidroxi-3-metilglutamil coenzima A (HMG-CoA) reductasa) se observó una inhibición del crecimiento más fuerte que en células tratadas con ONCONASA solamente (Mikulski S. M., y col., 1990, Cell Tissue Kinet. 23(3): 237-46). Por lo tanto, resulta evidente una posibilidad de desarrollar regímenes de terapia de combinación con mayor eficacia y/o menor toxicidad.

La RNasa seminal bovina es un miembro único de la familia de RNasa A, puesto que es la única RNasa que contiene un dímero de subunidades de tipo RNasa A unidas por dos enlaces disulfuro. Además, mantiene la regulación alostérica tanto por sustrato como por productos de reacción. La regulación se produce en la fase de hidrólisis de nucleótidos cíclicos. Tiene la capacidad de escindir ARN tanto mono como bicatenario. BS-RNasa es altamente citotóxica. Presenta efecto antitumoral *in vitro* en células leucémicas de ratón, células HeLa y de pulmón de embrión humano, células de neuroblastoma de ratón y fibroblastos humanos y líneas celulares de plasmacitoma de ratón. Cuando se administran *in vivo* a ratas que portan carcinomas sólidos (carcinoma folicular tiroideo y sus metástasis pulmonares), BS-RNasa induce una reducción drástica del peso tumoral, sin efectos tóxicos detectables en los animales tratados (Laccetti, P. y col., 1992, Cancer Research 52: 4582-4586). La BS-RNasa monomerizada artificialmente tiene mayor actividad ribonucleasa pero menor citotoxicidad que la BS-RNasa dimérica nativa (D'Allesio G., y col., 1991, TIBS: 104-106). Esto, de nuevo, indica la importancia de la estructura molecular para la actividad biológica. Parece que como la ONCONASA, BS-RNasa se une a sitio o sitios de reconocimiento en la superficie de las células diana, antes de la penetración en células diana.

Además de ser citotóxica, BS-RNasa también es inmunosupresora. BS-RNasa puede bloquear la proliferación de linfocitos T activados, y prolongar la supervivencia de injertos cutáneos trasplantados en ratones alogénicos. La actividad inmunosupresora de SB-RNasa se explica por la necesidad de proteger los espermatozoides del sistema inmune femenino.

T2-RNasas

En plantas, la autocompatibilidad es abundante y es eficaz en la prevención de autofertilización. El polen que porta un alelo particular en el locus S, que controla la autoincompatibilidad, es incapaz de fertilizar plantas que porten el mismo alelo S. En muchas plantas autoincompatibles, especialmente miembros de *Solanaceae* y *Rosaceae*, S-RNasa, un miembro de la familia de T2-RNasa, se secreta por los órganos femeninos. La S-RNasa reconoce específicamente polen propio y detiene su crecimiento en el estigma o estilo antes de que se produzca la fertilización (Clarke, A. E. y Newbiggin, E., 1993, Ann. Rev. Genet. 27: 257-279). Se cree que la detención del crecimiento del tubo polínico es una consecuencia directa de la degradación de ARN, sin embargo el modo de entrada de S-RNasa en la célula del tubo aún no está claro.

Se identificaron por primera vez miembros de la familia de RNasa T2 en hongos (Egami, F. y Nakamura, K. 1969, Microbial ribonucleases. Springer-Verlag, Berlín). Desde entonces, se han descubierto en una amplia diversidad de organismos, que varían de virus a mamíferos. En particular, las T2-RNasas muestran una distribución mucho más amplia que la exhaustivamente descrita familia de RNasa A. Sin embargo, el papel *in vivo* de T2-RNasas en células de mamífero aún no se conoce.

En microorganismos, se acepta generalmente que las T2-RNasas extracelulares contribuyen a la digestión de polirribonucleótidos presentes en el medio de crecimiento, dando lugar de este modo a nutrientes que pueden difundirse. También pueden actuar como agentes de defensa (Egami, F. y Nakamura, K., 1969, Microbial ribonucleases. Springer-Verlag, Berlín).

En plantas, las T2-RNasas desempeñan un papel en el proceso de polinización, limitando significativamente la elongación de los tubos polínicos que se dirigen hacia los óvulos (Roiz, L. y Shoseyov, O., 1995, Int. J. Plant Sci. 156: 37-41, Roiz L. y col., 1995, Physiol. Plant. 94: 585-590). Hasta la fecha, el mecanismo por el que estas RNasas afectan a los tubos polínicos no está claro.

Por lo tanto, existen pocos ejemplos de ribonucleasas citotóxicas que puedan usarse eficazmente como agentes de tratamiento para cáncer. Se necesitan nuevas ribonucleasas con actividades antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo para células de mamífero para potenciar el espectro de agentes terapéuticos disponibles para tratamiento de cánceres humanos, para abrir de este modo nuevos horizontes en el campo del tratamiento de cáncer.

Existe por lo tanto una necesidad ampliamente reconocida y sería altamente ventajoso tener una nueva ribonucleasa que tenga utilidad potencial en el tratamiento de enfermedad proliferativa humana, tal como cáncer.

Sumario de la invención

La ribonucleasa de la familia T2 para su uso en la prevención, inhibición y/o inversión de la proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de células tumorales se define en la reivindicación 1 de la presente invención y la ribonucleasa de la familia T2 para su uso en la inhibición de angiogénesis de un tumor en un sujeto se define en la reivindicación 4 de la presente invención.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación se proporciona un procedimiento para prevenir, inhibir y/o invertir la proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de células que proliferan de forma anómala en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una ribonucleasa de la familia de T2.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un procedimiento para prevenir, inhibir y/o invertir la proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de células de proliferación anómala en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifique y sea capaz de expresar *in vivo* una ribonucleasa recombinante de la familia T2.

5 De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación se proporcionan procedimientos para (i) tratar un tumor en un sujeto; (ii) prevenir, inhibir y/o invertir el desarrollo de un tumor en un sujeto; (iii) prevenir, inhibir y/o invertir la transformación de un tumor benigno en un tumor maligno en un sujeto; (iv) prevenir, inhibir y/o invertir la angiogénesis tumoral en un sujeto; (v) reducir el número de tumores individuales; (vi) reducir la transformación tumoral en un sujeto; (vii) reducir varios tumores malignos en un sujeto; y (viii) prevenir, inhibir y/o invertir la
10 transformación de un tejido en un tumor en un sujeto, efectuándose cada uno de los procedimientos administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una ribonucleasa de la familia T2 o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polinucleótido que codifique y sea capaz de expresar *in vivo* una ribonucleasa recombinante de la familia T2.

15 De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como un principio activo, una ribonucleasa de la familia T2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como un principio activo, un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar *in vivo* una ribonucleasa recombinante de la familia T2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente divulgación se proporciona un procedimiento para preparar un medicamento útil para prevenir, inhibir y/o invertir la proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de células que proliferan de forma anómala que comprende la etapa de combinar una ribonucleasa de la familia T2 con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 De acuerdo con un aspecto adicional más de la presente invención se proporciona un procedimiento para preparar un medicamento útil para prevenir, inhibir y/o invertir la proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de células que proliferan de forma anómala que comprende la etapa de combinar un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar *in vivo* una ribonucleasa recombinante de la familia T2 con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la invención descritas posteriormente, la ribonucleasa de la familia T2 carece sustancialmente de actividad ribonucleolítica. Como se usa en el presente documento la frase "carece sustancialmente de actividad ribonucleolítica" se refiere a (i) una ribonucleasa inactivada (natural o recombinante) de la familia T2 que tiene 0-10 % de actividad ribonucleolítica en comparación con una ribonucleasa similar, no inactivada; y/o (ii) una ribonucleasa mutante recombinante (natural o inducida por el hombre) de la familia T2 que tiene 0-10 % de actividad ribonucleolítica en comparación con una ribonucleasa similar, no mutante. Puede efectuarse inactivación de la actividad ribonucleolítica de la ribonucleasa de la familia T2 por un
35 procedimiento seleccionado del grupo que consiste en hervido, autoclave y desnaturalización química.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas las células que proliferan de forma anómala son células cancerosas.

40 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la etapa de administrar al sujeto la cantidad terapéuticamente eficaz de la RNasa de la familia T2 se efectúa por un modo de administración seleccionado del grupo que consiste en administración oral, administración tópica, administración transmucosa, administración parenteral, administración rectal y por inhalación.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la ribonucleasa de la familia T2 es RNasa B1.

45 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas la ribonucleasa de la familia de ribonucleasa T2 se selecciona del grupo que consiste en RNasa T2, RNasa Rh, RNasa M, RNasa Trv, RNasa Irp, RNasa Le2, RNasa Phyb, RNasa LE, RNasa MC, RNasa CL1, RNasa Bsp1, RNasa RCL2, RNasa Dm, RNasa Oy y RNasa Tp.

50 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas se identifica que el medicamento proporciona un tratamiento para un trastorno o enfermedad proliferativo específico, tal como un cáncer específico.

55 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas las células que proliferan de forma anómala son células asociadas con un trastorno o enfermedad proliferativo seleccionado del grupo que consiste en papiloma, blastoglioma, sarcoma de Kaposi, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, astrocitoma, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, enfermedad de Burkitt, artritis, artritis reumatoide,

retinopatía diabética, angiogénesis, reestenosis, reestenosis en endoprótesis vascular y reestenosis de injerto vascular.

La presente invención aborda con éxito los defectos de las configuraciones conocidas en la actualidad caracterizando nuevas actividades de ribonucleasas de la familia T2 útiles en la prevención, inhibición e inversión de enfermedades o trastornos proliferativos, tales como cáncer.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos:

La FIGURA 1 es una representación gráfica de la absorbancia y actividad RNasa de RNasa B1 de *Aspergillus niger* aislada de acuerdo con las enseñanzas de Roiz, L. y Shoseyov, O., 1995, Int. J. Plant Sci. 156: 37-41. La gráfica A representa fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna EMD-TMAE de un filtrado en bruto, mientras que la gráfica B representa la fracción obtenida de cromatografía en columna MONO-Q de las fracciones activas que resultaron de la cromatografía EMD-TMAE del filtrado en bruto. La línea continua representa absorbancia a 280 nm y la línea discontinua representa actividad RNasa.

La FIGURA 2 es un cimgograma de SDS-PAGE que ilustran el aumento de la concentración de proteína RNasa B1 a lo largo de las etapas de purificación empleadas. El carril 1 representa el filtrado en bruto; el carril 2 representa el eluato de la columna EMD-TMAE; el carril 3 representa el eluato de la columna MONO-Q; el carril 4 representa el eluato del carril 3 ensayado *in situ* con respecto a actividad RNasa y teñido con azul de toluidina; el carril 5 representa la RNasa purificada después de desglucosilación por PNGasa F. Los carriles 1-3 y 5 se tiñen con azul de coomassie.

La FIGURA 3 es una gráfica que ilustra el efecto *in vitro* de diferentes concentraciones de B1 RNasa en germinación de polen de melocotón (línea continua con cuadrados negros) y longitud del tubo polínico (línea discontinua con cajas).

Las FIGURAS 4a y 4b ilustran el efecto de RNasa B1 en el crecimiento del tubo polínico de melocotón en el estigma y la parte superior del estilo. La Figura 4a representa la flor de control, mientras que la Figura 4b es una flor tratada con RNasa B1 antes de la polinización. Barra = 0,2 mm.

Las FIGURAS 5a y 5b ilustran el efecto de RNasa B1 en el crecimiento del tubo polínico en el estigma de un flor de mandarina. La Figura 5a representa una flor de control que se expuso a polinización abierta durante 48 horas. La Figura 5b representa una flor que se trató con RNasa B1 antes de la polinización. Barra = 0,1 mm.

Las FIGURAS 6a y 6b ilustran ensayo de viabilidad realizado en semillas de nectarina. La Figura 6a representa una semilla de control producida por una flor no tratada, mientras que la Figura 6b representa una semilla producida por una flor tratada con RNasa B1. Barra = 0,3mm.

La FIGURA 7 ilustra el efecto de RNasa B1, no tratada, hervida o sometida a autoclave, en la longitud del tubo polínico de lirio cv. Osnat.

Las FIGURAS 8a y 8b ilustran el efecto de RNasa B1 en tubos polínicos de lirios que crecen *in vitro* y teñidos con IKI.

Las FIGURAS 9a y 9b ilustran imágenes fijas capturadas de imágenes de video integrado que muestran movimiento de orgánulos y localización en tubos polínicos no tratados (Figura 9a) y tratados (Figura 9b) con RNasa B1.

Las FIGURAS 10a y 10b ilustran el efecto de RNasa B1 en filamentos de actina de un tubo polínico de lirio en crecimiento. La Figura 10a representa el tubo polínico de control mientras que la Figura 10b representa el tubo polínico tratado con RNasa B1. Ambos tubos polínicos se escindieron y se tiñeron con TRITC faloidina para visualización después de la experimentación.

La FIGURA 11 es una representación de Scatchard que representa la unión de RNasa B1 con actina. A – concentración de actina (μM), Rf – concentración de RNasa B1 libre (μM), Rb – concentración de RNasa B1 unida (μM).

Las FIGURAS 12a-c ilustran tubos polínicos de lirio teñidos con plata por inmunoro cultivados durante 1 hora. La Figura 12a representa un control, mientras que las Figuras 12b y 12c son ambos tubos polínicos tratados con RNasa B1. El tubo polínico de la Figura 12b se incubó con suero preinmune de conejo, mientras que el tubo polínico de la Figura 12c se incubó con anticuerpo policlonal de conejo anti-RNasa B1.

Las FIGURAS 13a y 13b ilustran el efecto de diferentes concentraciones de RNasa B1 en la viabilidad de células de cáncer de colon de HT29. Se cultivaron muestras repetidas de células durante 48 horas o durante 72 horas a 37 °C, se visualizaron usando tinción diferencial con azul de tripano y se contaron. La Figura 13a representa los números totales de células mientras que la Figura 13b representa el porcentaje de células muertas.

La FIGURA 14 ilustra el efecto de RNasa B1 en la clonogenicidad de células HT29. Las muestras repetidas de células se preincubaron con medio de crecimiento en ausencia o presencia de RNasa B1 10^{-6} M durante 48 horas, se tripsinizaron, se lavaron, se resuspendieron en medio de crecimiento sin RNasa B1 en diluciones en serie, y se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos para colonizar durante 14 días. Las colonias se contaron después de la fijación y tinción con azul de metileno.

La FIGURA 15 ilustra el efecto del periodo de exposición a RNasa B1 en la clonogenicidad de células HT29. Las muestras repetidas de células se preincubaron con medio de crecimiento que contenía RNasa B1 10^{-6} M durante 48 horas y después se permitió que colonizaran en medio de crecimiento que contenía la misma

concentración de RNasa B1, o en medio sin RNasa B1. La colonización se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos durante 7 días. Cada tratamiento contenía diferentes números iniciales de células por pocillo. Las colonias se contaron después de fijación y visualización en azul de metileno. Las células preincubadas y colonizadas en medio de crecimiento sin RNasa B1 actuaron como un control.

Las FIGURAS 16a-c ilustran el efecto de RNasa B1 en la capacidad de colonización de las células HT29. Las células de control (Figura 16a) se preincubaron durante 48 horas en medio de crecimiento sin RNasa B1 y después se tripsinizaron y se incubaron con el mismo medio de crecimiento en placas de microtitulación de 96 pocillos para colonización. La Figura 16b representa células que se preincubaron durante 48 horas en medio de crecimiento que contenía RNasa B1 10^{-6} M y después se permitió que colonizaran en medio de crecimiento sin RNasa B1. La Figura 16c representa células que se preincubaron y después se colonizaron en medio de crecimiento que contenía RNasa B1 10^{-6} M. Las colonias celulares se visualizaron usando tinción con azul de metileno.

La FIGURA 17 es un esquema de experimentos *in vivo* realizados en ratas, que describe el tratamiento para cada grupo de 6 ratas.

La FIGURA 18 demuestra el efecto de dos pH diferentes en la velocidad de liberación de RNasa B1 de microcápsulas CAP. Las microcápsulas que contenían 10 mg de RNasa B1 se suspendieron en 10 ml de HCl 0,1 M (pH 1) o tampón Tris 0,1 M (pH 8) y se incubaron a 37 °C con agitación. Se tomaron muestras de solución superior cada 30 minutos para ensayos de actividad RNasa.

Las FIGURAS 19a-d demuestran el efecto de RNasa B1 y/o DMH en la velocidad de crecimiento de ratas, como se muestra por el peso corporal al final de cada experimento. El peso inicial de las ratas fue de aproximadamente 200 gramos. n = 6. 19a – se proporcionó PBS, RNasa B1 o I-RNasa B1 mediante bombas osmóticas en las semanas 1-9 después de la primera inyección de DMH (tratamiento preventivo). Se usaron como control ratas tratadas como se ha descrito anteriormente, pero en ausencia de DMH. 19b – se proporcionó PBS, RNasa B1 o I-RNasa B1 mediante bombas osmóticas las semanas 12-17 después de la primera inyección de DMH (tratamientos terapéuticos). 19c – Las ratas se alimentaron con microcápsulas que contenían RNasa B1 o glucosa como un tratamiento preventivo. Se usaron como control ratas que se habían tratado con RNasa B1 en ausencia de DMH. 19d – Las ratas se alimentaron con microcápsulas que contenían RNasa B1 o glucosa.

Las FIGURAS 20a-c demuestran actividad RNasa en heces de ratas a las que se habían implantado bombas osmóticas que contenían RNasa B1 (20a), I-RNasa B1 (20b) o PBS (20c), como un tratamiento preventivo. Como control, las ratas se trataron con RNasa B1 o PBS en ausencia de DMH. La actividad RNasa se determinó como se describe en la sección de Ejemplos posteriormente.

La FIGURA 21 demuestra actividad RNasa en heces de ratas alimentadas con microcápsulas que contenían RNasa B1 o glucosa como un tratamiento preventivo. Como control, las ratas se alimentaron con RNasa B1 o glucosa en ausencia de DMH. La actividad RNasa se determinó como se describe en la sección de Ejemplos posteriormente.

La FIGURA 22 muestra el número de focos de criptas aberrantes (ACF) en colon distal (5 cm) de ratas a las que se habían implantado bombas osmóticas como un tratamiento preventivo (n = 6).

Las FIGURAS 23a-c demuestran el efecto de RNasa B1 en diferentes parámetros examinados en el colon distal (5 cm) de ratas alimentadas con RNasa B1 microencapsulada o glucosa, como tratamiento preventivo (n = 6). 23a – número de tumores por colon; 23b – tamaño tumoral; 23c - ACF por colon.

Las FIGURAS 24a-d demuestran diferentes tipos de tumores, como se fotografían en la superficie de mucosa interna 1 hora después de la escisión. 24a – tumores rojos; 24b – tumores blancos. 24c – un tumor rosa y un tumor rojo; 24d – distribución de tres tipos de tumores en ratas alimentadas con microcápsulas que contenían glucosa o RNasa B1, como tratamiento preventivo.

Las FIGURAS 25a-d muestran examen histopatológico de tumores teñidos con hematoxilina de Mayer y amarillo de martius. 25a – un adenoma o adenopapiloma – un tumor benigno; 25b - adenocarcinoma, en el que penetraron células de la mucosa por debajo de la submucosa; 25c – un adenocarcinoma bien desarrollado, en el que el ordenamiento tisular está completamente alterado; 25d – patrón de distribución de tipos de adenoma y adenocarcinoma de tumores en cólores de rata tratados con glucosa encapsulada o RNasa B1, como tratamiento preventivo.

Las FIGURAS 26a-c demuestran el efecto de RNasa B1 en diferentes parámetros examinados en el colon distal (5 cm) de ratas tratadas con bombas osmóticas que contienen PBS, RNasa B1 o I-RNasa B1 como tratamiento terapéutico. 26a – número de tumores por colon; 26b – distribución de tumores de acuerdo con el tamaño; 26c – distribución de tumores de acuerdo con el color, lo que indica angiogénesis.

Las FIGURAS 27a-c demuestran el efecto de RNasa B1 en diferentes parámetros examinados en el colon distal (5 cm) de ratas alimentadas con RNasa B1 microencapsulada o glucosa como tratamientos terapéuticos. 27a – número de tumores por colon; 27b – distribución de tumores de acuerdo con el tamaño; 27c – distribución de tumores de acuerdo con el color, lo que indica angiogénesis.

Las FIGURAS 28a-b muestran células cultivadas HT-29 4-d de carcinoma de colon humano teñidas con TRIRC para actina. 28a – células de control; 28b – células que se cultivaron en presencia de RNasa B1 10^{-6} M.

Las FIGURAS 29a-b muestran células cultivadas HT-29 4-d de carcinoma de colon humano inmunoteñidas para actina de membrana. 29a – células de control; 29b – células cultivadas en presencia de RNasa B1 10^{-6} M.

Las FIGURAS 30a-c muestran células cultivadas HT-29 4-d de carcinoma de colon humano inmunoteñidas con FITC. Se usó anti-RNasa B1 como el anticuerpo primario. 30a – células de control; 30b – células que se cultivaron en presencia de RNasa B1, que muestran RNasa B1 unida en la superficie celular; 30c – se usó

suero preinmunizado (PIS) como anticuerpo primario.

La FIGURA 31 demuestra el efecto de diferentes tratamientos con proteínas en la longitud del tubo polínico del lirio. Los tubos polínicos se cultivaron *in vitro* durante 1 hora a 25 °C como se describe en la sección de Ejemplos a continuación.

5 **Descripción de las realizaciones preferidas**

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no quede dentro de las reivindicaciones se proporciona solamente para informar.

10 La presente invención enseña el uso de una ribonucleasa de la familia T2 o un polinucleótido que la codifica, para prevenir, inhibir y/o invertir la proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de células que proliferan de forma anómala en un sujeto. La presente invención enseña además composiciones farmacéuticas que contienen, como principio activo, una ribonucleasa de la familia T2 o un polinucleótido que la codifica para tratar enfermedades o trastornos proliferativos en general y cáncer en particular.

15 El uso de ribonucleasas con actividad citotóxica para inhibir la proliferación de células tumorales no es nuevo y se ha demostrado previamente en la técnica. Se ha mostrado que una ribonucleasa de la familia A que se conoce en el mercado como ONCONASA inhibe la proliferación celular en tejido tumoral en ensayos clínicos. También se ha demostrado que varias otras RNAsas de la superfamilia de RNasa A tienen actividad citotóxica además de su actividad ribonucleolítica.

20 Aunque la citotoxicidad de algunas ribonucleasas depende en cierto grado de la actividad ribonucleolítica, el nivel de actividad ribonucleolítica no siempre se correlaciona con el nivel de citotoxicidad observado para ribonucleasas. Además, existen varios ejemplos de ribonucleasas que no presentan actividad citotóxica en absoluto, pero actúan bien como ribonucleasas. El ejemplo más conocido es RNasa A. En otros casos, la tasa de reacción se escarifica para unión más específica o función mejorada en alguna otra capacidad. Por ejemplo, el sitio activo de la angigenina está bloqueado por cadenas laterales que no están presentes en RNasa A, haciéndolo 10.000 veces menos activo en sustratos generales, pero más específico en la escisión de ARN ribosómico. La BS-RNasa es una nucleasa más rápida cuando es monomérica. Sin embargo, su citotoxicidad es mayor, y la inhibición por inhibidor de ribonucleasa se reduce considerablemente en la forma dimérica. La RNasa B glicosilada es menos activa que RNasa A en la mayoría de los sustratos, mientras que una desamidación frecuentemente observada en BS-RNasa (asparagina 67 a isoaspartato) reduce la actividad de los mutantes de RNasa A escindiendo una cadena completa de estructuras de enlace H en la proteína (revisado en Shein, C. H. 1997. Nature Biotechnol 15: 529-536).

30 Las ribonucleasas de la familia T2 se caracterizan por sus características moleculares únicas. Se resume una comparación entre miembros de RNasa de las familias A y de las T2 posteriormente en la Tabla 1 (la localización de aminoácidos es después de RNasa A y RNasa T2 en las familias A y T2, respectivamente).

35 La ribonucleasa de la familia T2 para su uso en la prevención del desarrollo de cáncer de la presente invención se define en la reivindicación 1, la ribonucleasa de la familia T2 para su uso en la inhibición de angiogénesis de un tumor de la presente invención se define en la reivindicación 8.

TABLA 1

Característica	RNasa A	RNasa T2
Masa molecular	11-14 kDa (con la excepción de BS-RNasa)	24-36 kDa.
Temperatura óptima para actividad RNasa:	37 °C	50-60 °C
pH óptimo para actividad RNasa:	6,5-8	3,5-5
	No glicosilado	12-25 % de la masa molecular total
Especificidad de base:	Específico de base pirimidina	No específico con preferencia por ácido adenílico.

(continuación)

Característica	RNasa A	RNasa T2
Enlaces disulfuro:	<p><u>Cuatro:</u></p> <p>Común: Cys28-84, Cys40-96, Cys58-110.</p> <p>En RNasas pancreáticas el cuarto enlace S-S se localiza entre Cys65-72, formando un bucle que contiene Glu69 y Asn71, que son parte del sitio de unión a nucleótidos.</p> <p>En ONCONASA y lectina de rana toro Cys87-Cys104 forman un bucle COOH-terminal, que se localiza cerca del sitio activo. Las angiogeninas tienen solamente 3 enlaces disulfuro.</p>	<p><u>Cinco:</u></p> <p>Cys3-20, Cys10-53, Cys19-120, Cys63-112 y Cys182-213.</p>
Mecanismo de la actividad RNasa:	<p><u>Sitio activo</u></p> <p><u>Dos etapas en la extensión de ARN</u></p> <p>(i) His12 actúa como una base general y retira un protón del grupo 2'-hidroxilo del ARN. His 119 actúa como un ácido general, donando un protón del O 5' del nucleótido saliente. (ii) Los nucleótidos 2'3'-cíclicos resultantes se hidrolizan, con los papeles de His12 y His119 invertidos. Lys41 estabiliza el estado de transición pentavalente.</p> <p><u>Sitios de unión a sustrato:</u></p> <p>Gln11 y Phe120 forman enlaces de hidrógeno con el sustrato. En ONCONASA y lectina de rana toro Glu11 forma enlace H con el fosfato del sustrato. Gln96, Asn71, Glu111, de los que Asn71 es el más conservado, podrían catalizar escisión de ARN.</p>	<p><u>Sitio activo</u></p> <p>La catálisis de ARN es similar a RNasa A. His46 e His109 actúan como catalizadores ácido y básico generales.</p> <p>Glu 105 y Lys108 podrían desempeñar un papel en la polarización del enlace P=O del sustrato o en la estabilización del estado de transición pentacovalente.</p> <p><u>Sitios de unión a sustrato:</u></p> <p>His104 (en plantas es Tyr o Asp) podría actuar como el receptor de fosfato del sustrato.</p> <p>Hay dos sitios de reconocimiento:</p> <p>El sitio principal (B1) contiene Tyr57, Trp49 y Asp51. Asp51 es responsable del reconocimiento de la base adenina. Un sitio menor (B2) contiene Phe101, Gln95, Asn94, Ser93, Pro92 y Gln32.</p>

Las ribonucleasas de la familia T2 se han identificado en numerosos microorganismos, así como en plantas, en las que desempeñan un papel activo en el proceso de polinización, limitando selectivamente la elongación de tubos polínicos que se dirigen hacia los óvulos.

- 5 Como se ha descubierto por los inventores de la presente invención y como se detalla adicionalmente posteriormente en el presente documento en los Ejemplos 1, 2 y 6, la RNasa B1, una ribonucleasa T2, ribonucleolíticamente activa o ribonucleolíticamente no activa, se une específicamente a actina en tubos polínicos en elongación para inhibir de este modo la elongación de los tubos polínicos y también a actina de células de mamífero.

- 10 Se sabe que la actina forma filamentos que son componentes citoesqueléticos esenciales de las células, activos tanto en el mantenimiento de la estructura celular como en el soporte del transporte intracelular de orgánulos. Como resultado, los filamentos de actina participan en muchos procesos celulares durante el ciclo de vida de células normales y anómalas, incluyendo proliferación, colonización, diferenciación, transformación y otros aspectos del desarrollo incluyendo formación de tejido. Numerosos estudios han mostrado que la actina también participa en diversos procesos celulares que controlan la generación de células de cáncer (Jordan, M. A. & Wilson, L. 1998. Curr. Opin. Cell Biol. 10: 123-130; Jammy, P. A. & Chaponnier, C. 1995. Curr. Opin. Cell Biol. 7: 111-117; Sigmund, S. H. 1996. Curr. Opin. Cell Biol. 8: 66-73; Tapon, N. y col. 1997. Curr. Opin. Cell Biol. 9: 86-92). Por lo tanto, por ejemplo, los filamentos de actina participan en proliferación de células anómalas (Assoian, R. K. & Zhu, X. 1997. Curr. Opin. Cell Biol. 9: 93-98). Se descubrieron células malignas más sensibles a citocalasina B que las células normales

(Hemstreet G. P. y col. 1996. J. Cell Biochem. 25S: 197-204).

5 Puesto que la actina es una proteína altamente conservada, que mantiene un alto nivel de homología entre organismos evolutivamente distantes, se ha presentado la hipótesis de que la actividad de unión a actina de RNasa B1, que inhibe la elongación del tubo polínico puede utilizarse, sin quedar limitado por esta teoría, para unirse específicamente a actina de células de mamífero, para inhibir de este modo la proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de las mismas.

10 Reduciendo a la vez la presente invención a la práctica y como se describe adicionalmente en el Ejemplo 2 y 5 de la sección de Ejemplos, la RNasa B1 exógena se une específicamente a actina de membrana y provoca un trastorno de la red de actina celular. Como se muestra en los Ejemplos 3-5, el efecto de RNasa B1 en células de cáncer de mamífero se investigó adicionalmente *in vitro* e *in vivo*. Como se demuestra claramente allí, la RNasa B1 (i) reduce sustancialmente la proliferación y/o colonización de células de adenocarcinoma crecidas en cultivo; y (ii) reduce el número de focos de criptas aberrantes (ACF), reduce el número y tamaño de tumores, interfiere con la angiogénesis tumoral, reduce la malignidad de los tumores y la transición de adenoma a adenocarcinoma en un modelo de rata de carcinoma de colon, de una manera preventiva y/o terapéutica, mientras que no tiene efectos secundarios evidentes en el tejido sano en el colon o en otro lugar.

15 Una o más ribonucleasas de la familia T2 se denominan colectivamente en el presente documento T2-RNasa. De forma similar, uno o más polinucleótidos que codifican una o más ribonucleasas de la familia T2 se denominan colectivamente en el presente documento un polinucleótido que codifica una T2-RNasa (o la misma).

20 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para prevenir, inhibir y/o invertir la proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de células que proliferan de forma anómala en un sujeto. El procedimiento de acuerdo con este aspecto de la presente invención se efectúa administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una ribonucleasa de la familia T2 o de un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar *in vivo* una ribonucleasa recombinante de la familia T2, por sí mismo o como un principio activo de una composición farmacéutica.

25 Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, una ribonucleasa de la familia T2, un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar *in vivo* una ribonucleasa recombinante de la familia T2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención se proporciona un procedimiento para preparar un medicamento útil para prevenir, inhibir y/o invertir la proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de células que proliferan de forma anómala que comprende la etapa de combinar una ribonucleasa de la familia T2 o un polinucleótido que codifique y sea capaz de expresar *in vivo* una ribonucleasa recombinante de la familia T2, con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 El medicamento se identifica preferentemente como proveedor de un tratamiento para un trastorno o enfermedad proliferativo específico, tal como cáncer específico. Puede realizarse dicha identificación impresa en, por ejemplo, un recipiente que contenga el medicamento o en un folleto, como se conoce bien en la técnica.

40 El procedimiento y composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para, por ejemplo, (i) tratar un tumor en un sujeto; (ii) prevenir, inhibir y/o invertir el desarrollo de un tumor en un sujeto; (iii) prevenir, inhibir y/o invertir la transformación de un tumor benigno en un tumor maligno en un sujeto; (iv) prevenir, inhibir y/o invertir la angiogénesis tumoral en un sujeto; (v) reducir el número de tumores individuales en un sujeto; (vi) reducir el tamaño tumoral en un sujeto; (vii) reducir un número de tumores malignos en un sujeto; y/o (viii) prevenir, inhibir y/o invertir la transformación de un tejido en un tumor en un sujeto.

45 La T2-RNasa puede derivar de un fuente nativa, como se ejemplifica adicionalmente en el Ejemplo 1 a continuación, o, como alternativa, puede producirse como una proteína recombinante usando un polinucleótido (véase Tabla 2 posteriormente y las siguientes descripciones) y sistema de expresión apropiados. La expresión y purificación de proteínas recombinantes se conocen bien en la técnica y pueden efectuarse por una cualquiera de una pluralidad de técnicas alternativas descritas en detalle en uno cualquiera de varios libros de texto y libros de protocolo de laboratorio, incluyendo, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998).

TABLA 2

Fuente	Nombre (Prot)	Nombre (Gen)	Referencia o referencias	Nº de Acceso de GeneBank
Bacterias	<i>Aeromonas hydrophila</i>		Locus RNI Favre, D. y col. 1993. J. Bacteriol. 175: 3710-3722.	Q07465
	<i>Haemophilus influenzae</i>	RNasa HI0526	Locus RN26 Fleischmann, R. D., y col. 1995. Science 269: 496-512.	P44012
	<i>Escherichia coli</i>	RNasa I	Locus RNI Meador, J. III. & Kennell, D. 1990. Gene 95:1-7. Oshima, T., y col. 1996. DNA Res. 3: 137-155. Henikoff, S. & Henikoff, J. G. 1994. Genomics 19: 97-107.	P21338
	<i>Aspergillus oryzae</i>	RNasa T2	rnt B Kawata Y. y col. 1988. Eur J. Biochem 176(3): 683-97. Kawata Y. y col. 1990. Eur J. Biochem 187: 255-62. Ozeki K, y col. 1991. Curr Genet. 19: 367-73.	P10281
Hongos	<i>Rhizopus niveus</i>	RNasa Rh	Horiuchi, H. y col. 1988. J. Biochem. 103: 408-418. Kurihara, H. y col. 1992. FEBS Lett. 306: 189-192. Kurihara, H. y col. 1996. J. Mol. Biol. 255: 310-320. Ohgi, K. y col. 1991. J. Biochem. 109: 776-785.	P08056
	<i>Trichoderma viride</i>	RNasa Trv	Inada, Y. y col. 1991. J. Biochem. 110 (6), 896-904.	P24657
	<i>Lentinula edodes</i> (hongo shiitake)	RNasa Irp	Kobayashi, H. y col. 1992. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56: 2003-2010.	AAB24971
	<i>L. edodes</i>	RNasa Le2	Kobayashi, H. y col. 1992. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56: 2003-2010. Shimada, H. y col. 1991. Agric. Biol. Chem. 55: 1167-1169.	P81296
	<i>Irpex lacteus</i>	RNasa Irp1	Watanabe, H., y col. 1995. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59: 2097-2103.	AAB35880

ES 2 396 998 T3

(continuación)

Fuente	Nombre (Prot)	Nombre (Gen)	Referencia o referencias	Nº de Acceso de GeneBank	
	<i>Physarum polycephalum</i>	RNasa Phyb	Inokuchi, N. y col. 1993. J. Biochem. 113:425-432.	P81477	
Plantas	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RNS2	Locus RNS2	Green, P. J. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5118-5122.	P42814
	<i>A. thaliana</i>	RNasa 3	Locus RNS3	Bariola, P. A., y col. 1994. Plant J. 6: 673-685.	P42815
	<i>A. thaliana</i>	RNasa 1	Locus RNS1	Bariola, P. A., y col. 1994. Plant J. 6: 673-685.	P42813
	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate cultivado)	RNasa LE	RNALE	Kock, M. y col. 1995. Plant Mol. Biol. 27: 477-485. Jost, W. y col. 1991. Eur. J. Biochem. 198: 1-6.	P80022
	<i>L. esculentum</i>	RNasa LX	RNLX	Kock, M., y col. 1995. Plant Mol. Biol. 27: 477-485. Loffler, A., y col. 1993. Eur. J. Biochem. 214: 627-633.	P80196
	<i>Nicotiana glauca</i> (tabaco)	S-RNasa	S	Anderson, M. A., y col. 1986. Nature 321: 38-44. Matton, D. P. y col. 1995. Plant Mol. Biol. 28: 847-858. McClure, B. A. y col. 1989. Nature 342: 95-97.	P04002
	<i>Malus domestica</i> (manzano)	S-RNasas	S	Sassa, H., y col. 1996. Mol. Gen. Genet. 250: 547-557.	
	<i>Pyrus pyrifolia</i> (Pera del Japón)	S-RNasas	S	Norioka, N., y col. 1996. J. Biochem. 120: 335-345.	
<i>Momordica charantia</i> (melón amargo)	RNasa MC	Locus RNMC	Blaxter, M. L., y col. 1996. Mol. Biochem. Parasitol. 77: 77-93. Ide, H. y col. 1991. FEBS Lett. 284: 161-164. Ide, H. y col. 1991. FEBS Lett. 289: 126.	P23540	
Animales	<i>Gallus gallus</i> (pollo)	RNasa CL1	Uchida, T. y col. 1996. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60: 1982-1988.	JC5126	

(continuación)

Fuente	Nombre (Prot)	Nombre (Gen)	Referencia o referencias	Nº de Acceso de GeneBank
<i>Rana catesbeiana</i> (rana toro)	RNasa RCL2		Yagi, H. y col. 1995. Biol. Pharm. Bull. 18: 219-222. Liao, Y. D. y col. 1996. Protein Expr Purif. 7: 194-202. Liao YD, y col. 1994. Eur J Biochem. 222: 215-20. Liao, Y. D. y col. 1998. J. Biol. Chem. 273: 6395-401	PC2347
<i>Drosophyla melanogaster</i>	RNasa DM	DmRNasa	Lankenau, D. H. y col. 1990. Chromosoma 99: 111-117. Hime, G., y col. 1995. Gene 158:203-207.	X15066
<i>Crassostera gigus</i> (ostra del pacífico)	RNasa Oy	Locus JX0295	Watanabe, H. y col. 1993. J. Biochem. 114:800-807.	JX029
<i>Todarodes pasificus</i> (pota Japonesa)	RNasa Tp		Kusano, A. y col. 1998. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62:87-94.	PMID 9501521
<i>Homo sapiens</i>	Precursor de RNasa 6	RNasa 6PL	Trubia, M. y col. 1997. Genomics 42: 342-344.	NP003721

Como se detalla adicionalmente en los Ejemplos 2 y 6 posteriores, se ha mostrado por los inventores de la presente invención que las actividades antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo de RNasa B1 no dependen de su actividad ribonucleolítica, puesto que la RNasa B1 hervida, sometida a autoclave e inactivada químicamente (acetilada), que tiene poca (10 %) o sustancialmente ninguna (0-10 %) actividad ribonucleolítica conservó sustancialmente todas sus actividades antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo.

Por lo tanto, una proteína T2-RNasa de acuerdo con la presente invención puede utilizarse tanto en una forma nativa, ribonucleolítica activa, o, como alternativa, en una forma silenciosa, o ribonucleolítica reprimida, que no tiene ninguna (0 %) o tiene poca (hasta 10 %) actividad ribonucleolítica pero que mantiene sus otras actividades. Como tal, el término "T2-RNasas" pretende abarcar todas las formas antiproliferativas, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo de la proteína, independientemente de otras actividades de la misma.

Se apreciará que la utilización de una T2-RNasa, directamente o expresada a partir de un polinucleótido, que presenta una actividad deseada y aun así está desprovista de, o reprimida en, actividad ribonucleolítica es particularmente ventajosa puesto que la actividad ribonucleolítica puede producir efectos secundarios indeseados en un sujeto.

Puede producirse un polipéptido que representa la secuencia de aminoácidos de una T2-RNasa como se define en el presente documento por cualquiera de varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede producirse de forma sintética por técnicas de síntesis peptídica convencionales, por ejemplo usando química de 9-fluorenilmetoxicarbonilo convencionales (F-Moc) (véase, por ejemplo, Atherton, E. y Sheppard, R. C. 1985, J. Chem. Soc. Chem. Comm. 165) o química de butiloxicarbonato convencional (T-Boc), aunque se observa que, más recientemente, el sistema de fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc)/terc-butilo, desarrollado por Sheppard ha encontrado una aplicación crecientemente más amplia (Sheppard, R. C. 1986 Science Tools, The LKB Journal 33, 9).

Como alternativa, una proteína T2-RNasa puede aislarse o purificarse por procedimientos bien conocidos en la técnica a partir de organismos que se sabe que expresan esta proteína. Tales organismos incluyen, por ejemplo, *Aeromonas hydrophila*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Rhizopus niveus*, *Trichoderma viride*, *Lentinula edodes*, *Irpex lacteus*, *Physarum polycephalum*, *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana glauca*, *Malus domestica*, *Pyrus pyrifolia*, *Momordica charantia*, *Gallus gallus*, *Rana catesbeiana*, *Drosophyla melanogaster*, *Crassostera gigus*, *Todarodes pasificus* y *Homo sapiens*. Se anticipa,

sin embargo, que también podrían usarse otros organismos que aún no se conoce que produzcan T2-RNasa, una vez descubiertos como tales, como una fuente de T2-RNasa de acuerdo con la presente invención.

Como alternativa y preferentemente una proteína T2-RNasa puede producirse recombinantemente expresando un polinucleótido que la codifique, usando un sistema de vector de expresión apropiado. Preferentemente, se selecciona un sistema de expresión que proporciona modificaciones postraduccionales adecuadas. Los sistemas de vector de expresión adecuados incluyen, pero sin limitación, células de mamífero infectadas con un virus (por ejemplo, adenovirus, retrovirus, virus de herpes simple, virus de viruela aviar); células de insecto infectadas con un virus (por ejemplo, baculovirus); plantas modificadas genéticamente o células vegetales transformadas con un plásmido, un virus vegetal o una *Agrobacterium*; microorganismos transformados tales como levaduras que contienen vectores de levadura, o bacterias transformadas con ADN de bacteriófago, ADN plasmídico o ADN de cósmido. Los elementos de control de la expresión de vectores varían en sus fuerzas y especificaciones dependiendo del sistema de huésped-vector utilizado, puede usarse uno cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados. Una T2-RNasa producida de forma recombinante puede purificarse a partir de células huésped por cromatografía de afinidad, electroforesis, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), inmunoprecipitación, sedimentación o cualquier otro procedimiento conocido en la técnica.

Puede usarse una T2-RNasa purificada para preparar un medicamento de acuerdo con la presente invención por medio de procedimientos de mezcla convencional, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, inmovilización o liofilización con la adición de vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados o como alternativa puede unirse a vehículos de suministro apropiados como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Un polinucleótido de acuerdo con la presente invención puede codificar una proteína T2-RNasa nativa, cuyo término en este contexto describe una T2-RNasa que tiene actividades tanto antiproliferativas como ribonucleolíticas o, como alternativa, un polinucleótido de acuerdo con la presente invención puede codificar un mutante de T2-RNasa silencioso o reprimido, que tiene poca o ninguna actividad ribonucleolítica, para expresar (por ejemplo, transcribir y traducir) *in vivo* en una proteína que está sustancialmente sin actividad ribonucleolítica.

Como tal, el término "polinucleótido" cuando se usa en el presente documento en el contexto de T2-RNasas en general, o en el contexto de cualquier T2-RNasa específica se refiere a cualquier secuencia polinucleotídica que codifique una T2-RNasa activa en la prevención, inhibición y/o inversión de proliferación, colonización, diferenciación y/o desarrollo de células de proliferación anómala, que tiene o está sustancialmente desprovista de actividad ribonucleolítica. Pueden obtenerse polinucleótidos que codifican una T2-RNasa desprovista de actividad ribonucleolítica usando técnicas de biología molecular conocidas, tales como mutagénesis aleatoria, mutagénesis dirigida y técnicas de evolución potenciada. Puede emplearse fácilmente mutagénesis dirigida debido a que se han reconocido los restos de aminoácidos esenciales para la actividad ribonucleolítica de T2-RNasas (véase Kusano y col., 1998. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 87-94, que se incorpora en el presente documento por referencia, y Tabla 2 anterior).

Por lo tanto, la presente invención puede usarse para tratar afecciones, síndromes o enfermedades caracterizadas por células con proliferación anómala, tales como células cancerosas u otras, tales como, pero sin limitación, papiloma, blastoglioma, sarcoma de Kaposi, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, astrocitoma, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, enfermedad de Burkitt, artritis, artritis reumatoide, retinopatía diabética, angiogénesis, reestenosis, reestenosis en endoprótesis vascular y reestenosis de injerto vascular.

Como se usa en el presente documento los términos "cáncer" o "tumor" son términos clínicamente descriptivos que abarcan una multitud de enfermedades caracterizadas por células que muestran proliferación celular anómala. El término "tumor", cuando se aplica a tejido, generalmente se refiere a cualquier crecimiento tisular anómalo, caracterizado por proliferación celular excesiva y anómala. Un tumor puede ser "benigno" e incapaz de propagarse desde su foco original, o "maligno" o "metastásico" y capaz de propagarse más allá de su sitio anatómico a otras áreas en todo el cuerpo del huésped. El término "cáncer" un término antiguo que generalmente se usa para describir un tumor maligno o la patología que surge del mismo. Como alternativa, la técnica se refiere a un crecimiento anómalo como una neoplasia, y a un crecimiento anómalo maligno como una neoplasia maligna.

Cualquier ribonucleasa de la familia T2 que tenga las actividades antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo descritas en el presente documento y ejemplificadas en la sección de Ejemplos a continuación puede usarse como un agente terapéutico de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. De forma similar, cualquier polinucleótido que codifica una ribonucleasa de la familia T2 que tenga las actividades antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo descritas en el presente documento puede usarse como un agente terapéutico de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. Se proporciona una lista no exhaustiva de ribonucleasas de la familia T2 en la Tabla 2, anterior. Como se ejemplifica adicionalmente por los ejemplos a continuación, RNasa B1, que es un miembro de la familia T2, tiene actividades antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo como se determinó por ensayos *in vivo* e *in vitro*. Además, se ha mostrado que RNasa B1 se une a actina incluso cuando se trata para liberarla de actividad ribonucleasa. Por lo

- tanto, la presente invención proporciona tres ensayos diferentes con los que un experto habitual en la materia podría ensayar una ribonucleasa dada con respecto a sus actividades antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo, estos son un ensayo *in vitro* para determinar el efecto de la ribonucleasa ensayada en células cancerosas, ensayo *in vivo* para determinar el efecto de la ribonucleasa ensayada en el desarrollo tumoral, y otro ensayo *in vitro* para determinar la capacidad de la ribonucleasa ensayada para unirse a actina celular y/o libre. Sin limitar la presente invención por cualquier teoría, se cree que una capacidad de una ribonucleasa para unirse a actina es indicativa de que dicha ribonucleasa tiene actividades antiproliferación, anticolonización, antidiferenciación y/o antidesarrollo.
- 5 Puede administrarse una ribonucleasa de acuerdo con la presente invención a un organismo, tal como un ser humano o cualquier otro mamífero, por sí misma, o en una composición farmacéutica en la que se mezcla con vehículos adecuados o excipientes.
- 10 Como se usa en el presente documento una “composición farmacéutica” o “medicamento” se refiere a una preparación de una o más de las ribonucleasas o polinucleótidos que las codifican como se describe en el presente documento con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.
- 15 En el presente documento el término “excipiente” se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un compuesto. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.
- 20 Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más principios activos adicionales, tales como, pero sin limitación, agentes antiinflamatorios, agentes antimicrobianos, anestésicos y similares además del principio activo principal.
- Pueden fabricarse composiciones farmacéuticas de la presente invención por procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procedimientos de mezcla convencional, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, inmovilización o liofilización.
- 25 Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención pueden por lo tanto formularse de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración seleccionada.
- 30 Por lo tanto, efectuar la administración de la composición farmacéutica de la presente invención incluye un vehículo farmacéutico adecuado y una cantidad eficaz de una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifique, y se administra, por ejemplo, por vía tópica, vía intraocular, vía parenteral, vía oral, vía intranasal, vía intravenosa, vía intramuscular, vía subcutánea o por cualquier otro medio eficaz mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.
- 35 Para inyección por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea, una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifique puede formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Por ejemplo, puede administrarse una solución fisiológicamente apropiada que contiene una cantidad eficaz de una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica de forma sistémica a la circulación sanguínea para tratar un cáncer o tumor que no puede alcanzarse directamente o aislarse anatómicamente. Una solución fisiológicamente apropiada que contiene una cantidad eficaz de una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica puede inyectarse directamente en un tejido tumoral o cáncer diana por una aguja en cantidades eficaces para tratar las células tumorales del tejido diana.
- 40 Para administración transmucosa, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera para permear. Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica.
- 45 Para administración oral, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse fácilmente combinando una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos permiten que una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente. Pueden realizarse preparaciones farmacológicas para uso oral usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir adyuvantes adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes particulares son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido alginico o una sal de los mismos tales como alginato sódico.
- 55

Los núcleos de grageas se proporcionan con revestimientos adecuados. Para este fin, pueden usarse soluciones de azúcar concentrado que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o revestimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de principios activos.

Las composiciones farmacéuticas adicionales, que pueden usarse por vía oral, incluyen cápsulas de ajuste por presión compuestas de gelatina así como cápsulas blandas, selladas, compuestas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste por presión pueden contener una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica en mezcla con carga tal como lactosa, aglutinantes, tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, puede disolverse o suspenderse una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica en líquidos adecuados, tales como ácidos grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deberían estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración seleccionada.

El suministro oral de la composición farmacéutica de la presente invención puede no ser exitoso debido al pH y degradación enzimática presentes en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, dichas composiciones farmacéuticas deben formularse para evitar circunstancias indeseables. Por ejemplo, puede aplicarse revestimiento entérico a una formulación sólida oral. Se usan más habitualmente sustancias con propiedades resistentes a ácidos tales como celulosa acetato ftalato (CAP), hidroxipropil metilcelulosa ftalato (HPMCP) y resinas acrílicas para revestir comprimidos o gránulos para microencapsulación. Preferentemente se usa granulación húmeda para preparar los gránulos con revestimiento entérico para evitar reacciones entre el principio activo y el revestimiento (Lin, S. Y. y Kawashima, Y. 1987, Pharmaceutical Res. 4: 70-74). También puede usarse un procedimiento de evaporación de disolvente. El procedimiento de evaporación de disolvente se usó para encapsular insulina administrada a ratas diabéticas para mantener la concentración de glucosa en sangre (Lin, S. Y. y col., 1986, Biomater, Medicine Device, Artificial organ 13: 187-201 y Lin, S. Y. y col., 1988, Biochemical Artificial Cells Artificial Organ 16: 815-828). También se usó para encapsular materiales biológicos de alto peso molecular tales como antígeno viral y concanavalina A (Maharaj, I. Y col. 1984, J. Phamac. Sci. 73: 39-42).

Para administración bucal, la composición farmacéutica de la presente invención puede tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formuladas de manera convencional.

Para administración rectal pueden usarse supositorios como se conoce bien en la técnica.

Para administración por inhalación, se suministra convenientemente una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica para su uso de acuerdo con la presente invención en forma de una presentación de pulverización de aerosol a partir de un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas o cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla de polvo de una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica de la presente invención también puede formularse para administración parenteral, por ejemplo, por inyección de embolada o infusión continua. Puede presentarse una composición para inyección en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipiente de dosis múltiple, opcionalmente con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos u oleosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Adicionalmente, pueden prepararse suspensiones de una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica como suspensiones de inyección oleosa apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como etil oleato, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias, que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Como alternativa, una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica puede estar en una forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, sin pirógenos, antes de su uso.

La composición farmacéutica de la presente invención también puede formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además, un cáncer o tumor presente en una cavidad corporal, tal como en el ojo, tracto gastrointestinal, tracto genitourinario (por ejemplo, la vejiga urinaria), sistema pulmonar o bronquial y similares, puede recibir una composición fisiológicamente apropiada (por ejemplo, una solución tal como un tampón salino o de fosfato, una suspensión, o una emulsión, que es estéril) que contiene una cantidad eficaz de una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica mediante inyección directa con una aguja o mediante un catéter u otro tubo de suministro situado en el órgano hueco aquejado de cáncer o tumor. Puede usarse cualquier dispositivo de captura de imágenes tales como rayos X, sonograma o sistema de visualización de fibra óptica para localizar el tejido diana y guiar la aguja o tubo de catéter a las proximidades del mismo.

La composición farmacéutica de la presente invención también se puede suministrar por microbombas osmóticas. Las microbombas osmóticas se implantan en una de las cavidades corporales y el fármaco se libera constantemente al tejido para tratar. Este procedimiento es particularmente ventajoso cuando se experimenta una respuesta inmune a la composición farmacéutica. Este procedimiento se ha empleado para ONCONASA (Vasandani V. M., y col., 1996, Cancer Res. 15; 56(18): 4180-6).

Como alternativa y de acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, el vehículo farmacéuticamente aceptable incluye un vehículo de suministro capaz de suministrar una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica a la célula de mamífero del sujeto.

Se conocen en la técnica numerosos vehículos y procedimientos de suministro para dirigir proteínas o ácidos nucleicos a o al interior de tumores o células cancerosas. Por ejemplo, los liposomas son vesículas de membrana artificiales que están disponibles para suministrar proteínas o ácidos nucleicos a células diana (Newton, A. C. y Huestis, W. H., Biochemistry, 1988, 27: 4655-4659; Tanswell, A. K. y col., 1990, Biochimica et Biophysica Acta, 1044: 269-274; y Ceccoll, J. y col., Journal of Investigative Dermatology, 1989, 93: 190-194). Por lo tanto, una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica puede encapsularse con alta eficacia en vesículas de liposoma y suministrarse a células de mamífero. Además, la proteína T2-RNasa o ácido nucleico también puede suministrarse a células tumorales o cancerosas diana mediante micelas como se describe en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.925.628 de Lee, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Puede administrarse T2-RNasa encapsulada en liposoma o micela o un polinucleótido que la codifica por vía tópica, vía intraocular, vía parenteral, vía intranasal, vía intratraqueal, vía intrabronquial, vía intramuscular, vía subcutánea o por cualquier otro medio eficaz a una dosis eficaz para tratar las células que proliferan de forma anómala del tejido diana. Los liposomas pueden administrarse en cualquier composición fisiológicamente apropiada que contenga una cantidad eficaz de T2-RNasa encapsulada o un polinucleótido que la codifica.

Como alternativa y de acuerdo con otra realización preferida de la presente invención el vehículo de suministro puede ser, pero sin limitación, un anticuerpo o un ligando capaz de unirse a un receptor de superficie celular o marcador específico. Un anticuerpo o ligando puede unirse directamente a una proteína T2-RNasa o ácido nucleico mediante un engarce adecuado, o como alternativa dicho anticuerpo o ligando puede proporcionarse en la superficie de un liposoma que encapsula una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica.

Por ejemplo, una T2-RNasa o un polinucleótido que la codifica puede fusionarse con anticuerpos o ligandos de proteína de membrana específicos para dirigirse a tejidos o células específicos como se ha descrito previamente en la técnica. Se apreciará a este respecto que la fusión de RNasa A de la superfamilia de ribonucleasa A con anticuerpos para el receptor de transferrina o para el antígeno CD5 de linfocitos T conduce a la inhibición de síntesis proteica en células tumorales que portan un receptor específico para cada una de las toxinas anteriores (Rybak, M. y col., 1991, J. Biol. Chem. 266: 21202-21207 y Newton DL, y col., 1997, Protein Eng. 10(4): 463-70).

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el fin pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de los principios activos eficaz para prevenir, aliviar o mejorar síntomas de enfermedad o prolongar la supervivencia del sujeto que se trata.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Puede determinarse la toxicidad y eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la CI_{50} y la DL_{50} (dosis letal que provoca muerte en el 50 % de los animales ensayados) para un principio activo objeto. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse formulando un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosificación pueden seleccionarse por el médico individual a la vista de la condición del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl, y col., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", C. 1 p.1).

Dependiendo de la gravedad y sensibilidad de la afección para tratar, la dosificación también puede ser una administración única de una composición de liberación lenta, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varias

semanas o hasta que se efectúa la cura o se consigue disminución de la patología.

La cantidad de una composición para administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se trate, la gravedad de la afección, el modo de administración, el criterio del médico que la receta, etc.

5 Como ya se ha mencionado anteriormente en el presente documento, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, el principio activo de la composición farmacéutica es un polinucleótido que codifica una T2-RNasa.

De acuerdo con este aspecto de la presente invención el polinucleótido se introduce en la célula de mamífero junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, cuya introducción da como resultado una modificación genética de esta célula, permitiendo la expresión de una T2-RNasa en la misma.

10 Como se usa en el presente documento en la memoria descriptiva y en la sección de reivindicaciones posterior, la expresión "modificación genética" se refiere a un procedimiento de insertar ácidos nucleicos en células. La inserción puede, por ejemplo, efectuarse por infección viral, inyección, transfección, bombardeo de partículas o cualquier otro medio eficaz para introducir ácidos nucleicos en células, algunos de los cuales se detallan adicionalmente posteriormente en el presente documento. Después de la modificación genética el ácido nucleico se integra completo o parcialmente en el genoma de la célula (ADN), o permanece fuera del genoma de la célula, proporcionando de este modo células modificadas de forma estable o modificadas de forma transitoria.

15 Como tal, la composición farmacéutica de acuerdo con este aspecto de la presente invención puede utilizarse para terapia génica.

20 Como se usa en el presente documento, las frases "terapia génica" o "terapia genética" se usan de forma intercambiable y se refieren a un procedimiento de terapia en el que una modificación genética estable o transitoria de una célula o células proliferativas tales como células cancerosas, conduce a la inhibición de la proliferación de esta célula.

25 Puede emplearse uno cualquiera de los polinucleótidos identificados en la Tabla 2 por su número de acceso de Gene Bank de acuerdo con la presente invención como un polinucleótido que codifica una T2-RNasa. Además, también pueden emplearse polinucleótidos 40 % o más homólogos y/o que hibridan en condiciones de hibridación suaves y/o rigurosas con los polinucleótidos enumerados como un polinucleótido que codifica una T2-RNasa, siempre que la proteína codificada por los mismos se caracterice como una T2-RNasa y muestre las actividades deseadas. Además, se apreciará que también pueden emplearse partes, quimeras mutantes o alelos de tales polinucleótidos como un polinucleótido que codifica una T2-RNasa de acuerdo con la presente invención, de nuevo, siempre que tales partes, quimeras mutantes o alelos de tales polinucleótidos codifiquen una T2-RNasa que muestre las actividades deseadas.

30 También se prevé el aislamiento de nuevos polinucleótidos que codifiquen T2-RNasas. Dicho aislamiento puede efectuarse usando metodologías bien conocidas en la técnica tales como, pero sin limitación, exploración de bibliotecas, hibridación, amplificación por PCR, cebadores marcados, cebadores degenerados marcados. Pueden por lo tanto emplearse polinucleótidos tanto genómicos como de ADNc.

35 Puede fusionarse un polinucleótido de acuerdo con la presente invención, en fase, con cualquier otro polipéptido que codifique proteínas para codificar una proteína fusionada usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede fusionarse con una secuencia líder o un péptido señal para secreción. De forma similar una proteína T2-RNasa puede fusionarse (conjugarse) con otras proteínas usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Se conocen muchos procedimientos en la técnica para conjugar o fusionar (acoplar) moléculas de diferentes tipos, incluyendo proteínas. Estos procedimientos pueden usarse de acuerdo con la presente invención para acoplar una T2-RNasa a otras moléculas tales como ligandos o anticuerpos para ayudar de este modo en la dirección y unión de la T2-RNasa con tipos celulares específicos. Puede conjugarse cualquier par de proteínas o fusionarse entre sí usando cualquier procedimiento de conjugación conocido por un experto en la materia. Las proteínas pueden conjugarse usando un éster de N hidroxisuccinimida de ácido 3-(2-piridilditio)propiónico (también denominado N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato) ("SDPD") (Sigma, Cat. Nº P-3415), un procedimiento de conjugación con glutaraldehído o un procedimiento de conjugación con carbodiimida.

45 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el polinucleótido incluye uno o más segmentos que albergan secuencias de control de la transcripción unidas operativamente a la secuencia codificante de T2-RNasa. Tales secuencias de control de la transcripción pueden incluir, pero sin limitación, promotores y potenciadores como se detalla adicionalmente posteriormente en el presente documento. Estas secuencias de control de la transcripción están normalmente unidas operativamente cadena arriba de la región codificante y actúan en la regulación de la transcripción y/o traducción de la misma.

50 De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención el polinucleótido que codifica una T2-RNasa se incluye dentro de un vector de expresión eucariota. La frase "vector de expresión" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que incluye una secuencia que codifica una T2-RNasa y secuencias de control de la transcripción y que es capaz de expresar una T2-RNasa dentro de una célula de mamífero.

55

5 Se conocen numerosos procedimientos para la inserción de fragmentos de ADN en un vector, para los fines de expresión de genes de mamífero y pueden usarse para construir un vector de expresión de genes que codifican T2-RNasa que incluye secuencia de control de la transcripción/traducción apropiados y las secuencias de polinucleótidos de T2-RNasa deseadas. Estos procedimientos pueden incluir técnicas sintéticas y recombinantes de ADN *in vitro* y recombinación genética *in vivo*. La expresión de un polinucleótido que codifica una T2-RNasa puede regularse por secuencias de control de la transcripción de modo que se expresa una T2-RNasa en una célula huésped infectada o transfectada con la molécula de ADN recombinante. Por ejemplo, la expresión de una T2-RNasa puede controlarse por cualquier elemento promotor/potenciador conocido en la técnica. La activación del promotor puede ser específica de tejido o inducible por un producto metabólico o sustancia administrada.

10 Los promotores/potenciadores que pueden usarse para controlar la expresión de T2-RNasa dentro de tejidos o células diana incluyen, pero sin limitación, el promotor de RB nativo, el promotor/potenciador de citomegalovirus (CMV) (Karasuyama, H., y col., 1989, J. Exp. Med., 169: 13), el promotor de β -actina humana (Gunning, P., y col., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 4831-4835), el promotor inducible por glucocorticoides presente en la repetición terminal larga del virus del tumor de mama de ratón (HHTV LTR) (Klessig, D. F., y col., 1984, Mol. Cell Biol., 4: 1354-1362), las secuencias repetidas terminales largas de virus de leucemia murina de Holoney (MULV LTR) (Weiss, R., y col., 1985, RNA Tumor Viruses, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York), el promotor de región temprana de SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, Nature 290: 304-310), el promotor contenido en la repetición terminal 3' larga del virus del sarcoma de Rous (RSV) (Yamamoto y col., 1980, Cell 22: 787-797), el promotor/potenciador de timidina quinasa del virus del herpes simple (VHS) (Wagner y col., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster y col., 1982, Nature 296: 39-42), el promotor de adenovirus (Yamada y col., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82(11): 3567-71), y el promotor LAT del virus del herpes simple (Wolfe, J. H., y col., 1992, Nature Genetics, 1: 379-384).

25 Los vectores de expresión compatibles con células huésped de mamífero para su uso en terapia génica de células tumorales o cancerosas, incluyen, pero sin limitación, plásmidos, vectores retrovirales, vectores de adenovirus, vectores virales de herpes y virus de viruela aviar no replicantes, como se desvela, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.174.993, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Pueden usarse varios procedimientos para suministrar el vector de expresión de acuerdo con este aspecto de la presente invención a la célula o las células de mamífero diana.

30 Por ejemplo, puede administrarse un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado tal como una solución fisiológicamente apropiada y que contiene una cantidad eficaz de un vector de expresión por vía tópica, vía intraocular, vía parenteral, vía oral, vía intranasal, vía intravenosa, vía intramuscular, vía subcutánea o por cualquier otro medio eficaz.

35 Puede administrarse una solución fisiológicamente apropiada que contiene una cantidad eficaz de un vector de expresión por vía sistémica a la circulación sanguínea para tratar un cáncer o tumor que no puede alcanzarse directamente o anatómicamente aislado.

Para tratar masas tumorales puede inyectarse directamente una solución fisiológicamente apropiada que contiene una cantidad eficaz de un vector de expresión, mediante una aguja, a una masa tumoral diana en cantidades eficaces para tratar las células tumorales de la masa tumoral diana.

40 Como alternativa, un cáncer o tumor presente en una cavidad corporal, tal como en el ojo, tracto gastrointestinal, tracto genitourinario (por ejemplo, la vejiga urinaria), sistema bronquial y pulmonar y similares, puede recibir una composición fisiológicamente apropiada (por ejemplo, una solución tal como un tampón de fosfato o solución salina, que es estéril excepto para el vector de expresión) que contiene una cantidad eficaz de un vector de expresión mediante inyección directa con una aguja o mediante un catéter u otro tubo de suministro situado en el órgano hueco aquejado de cáncer o tumor. Puede usarse cualquier dispositivo de captura de imágenes eficaz, tal como rayos X, sonograma o sistema de visualización de fibra óptica para localizar el tejido diana y guiar la aguja o el tubo de catéter.

Se apreciará que puesto que un vector de expresión "desnudo" puede captarse de forma activa por células de mamífero, se potencia la captación y el suministro dirigido si el vector de expresión está envasado o encapsulado de forma apropiada.

50 Por lo tanto, de acuerdo con otra realización preferida de la presente invención el vehículo farmacéuticamente aceptable incluye un vehículo de suministro adecuado para el suministro del vector de expresión a células de mamífero de una manera dirigida.

55 Puede introducirse un vector de expresión viral por un vehículo de suministro a una célula diana en una forma expresable por infección o transducción. Dicho vehículo de suministro incluye, pero sin limitación, un retrovirus, un adenovirus, un virus del herpes y un virus de viruela aviar. Puede administrarse un vehículo de suministro capaz de introducir la construcción de vector en una célula diana y capaz de expresar T2-RNasa en la misma en cantidades que inhiben la proliferación celular por cualquier procedimiento eficaz descrito anteriormente en el presente documento.

Como alternativa, dicho vehículo de suministro puede incluir, pero sin limitación, un liposoma, una micela, un anticuerpo o un ligando como se ha descrito previamente anteriormente en el presente documento.

Se apreciará que los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden usarse en la preparación de un medicamento útil para inhibir la proliferación de una célula de un mamífero, mezclando el polinucleótido con un vehículo apropiado farmacéuticamente aceptable.

Como ya se han mencionado anteriormente en el presente documento, pueden obtenerse polinucleótidos que codifican una T2-RNasa por una diversidad de procedimientos, incluyendo, pero sin limitación, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de exploración de bibliotecas genómicas o de ADNc, usando cebadores específicos de T2-RNasa, usar PCR de transcripción inversa junto con cebadores específicos de T2-RNasa para amplificar ARNm aislado de organismos que se sabe que expresan T2-RNasas o aislar directamente secuencias de ADN que codifican una T2-RNasa de los organismos apropiados. Se apreciará en este caso que los procedimientos anteriormente mencionados pueden usarse también para aislar o generar cualquiera de las formas activas de una T2-RNasa descrita anteriormente en el presente documento.

El polinucleótido purificado puede insertarse después en vectores de expresión apropiados o proporcionarse con las secuencias de control de la transcripción apropiadas y prepararse como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Como se ejemplifica adicionalmente en la sección de Ejemplos a continuación y se ha mencionado anteriormente en el presente documento, también se proporciona un ensayo para determinar los efectos de una T2-RNasa específica o un polinucleótido que la codifica de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. Dicho ensayo se efectúa, por ejemplo, exponiendo células proliferativas a una T2-RNasa y siguiendo su comportamiento proliferativo a lo largo del tiempo en comparación con células de control no tratadas. Este ensayo puede emplearse no solamente para seleccionar la T2-RNasa más potente para cualquier aplicación específica, sino también para establecer la respuesta a dosis, que puede traducirse en dosificación de tratamiento inicial en experimentos *in vivo* o durante el tratamiento de un sujeto, todo como se ejemplifica adicionalmente en el presente documento para RNasa B1 de la familia T2. Se apreciará que este ensayo también puede usarse para determinar la parte o sitio activo antiproliferativo o una T2-RNasa, o para determinar la actividad de mutantes generados o aislados que no presentan actividad ribonucleolítica.

Objetos, ventajas y características nuevas adicionales de la presente invención resultarán evidentes para un experto en la materia tras el examen de los siguientes ejemplos, que no se pretende que sean limitantes. Además, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se ha descrito anteriormente en el presente documento y como se reivindica en la sección de las reivindicaciones posterior encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

En general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se exponen en las Patentes de Estados Unidos N° 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" de Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites y col. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton y Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); se describen exhaustivamente inmunoensayos disponibles en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak y col., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996).

Ejemplo 1

Caracterización de B1 RNasa de *Aspergillus niger* y su efecto inhibidor en el crecimiento de tubos polínicos en árboles frutales

Materiales y procedimientos**Preparación y purificación de RNasa extracelular de *A. niger***

Se cultivó *Aspergillus niger* B1 (CMI CC 324626) en cultivo líquido que contenía harina de trigo 1 % (p/v) y sulfato de amonio 0,05 % (p/v). La mezcla se ajustó a pH 3,5 con ácido clorhídrico y se sometió a autoclave. Se suspendió un inóculo de aproximadamente 10^6 esporas en 100 ml de medio y se incubó a 30 °C en un agitador orbital, a 200 rpm durante 100 horas. El medio de crecimiento se pasó a través de una membrana de 0,2 μm y se dializó tres veces frente a 10 volúmenes de acetato sódico 2 mM pH 6. Se cargaron dos litros de solución dializada en una columna Fractogel EMD-TMAE 650 (M) 26/10 (Merck), equilibrada con acetato sódico 20 mM pH 6. Las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de 500 ml de cloruro sódico 0-1,0 M en el mismo tampón, usando un sistema de cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC) (Pharmacia) con un caudal de 5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Las fracciones que mostraban la mayor actividad RNasa se agruparon y se dializaron frente a acetato sódico 2 mM pH 6, y se cargó una alícuota de 50 ml en una columna MONO-Q 5/5 HR (Pharmacia), equilibrada con acetato sódico 20 mM pH 6. La elución se realizó como con la columna EMD-TMAE, excepto que solamente se usaron 10 ml de un gradiente salino de 0-1,0 M, a un caudal de 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

Las proteínas se supervisaron a 280 nm y se midieron de acuerdo con Bradford (Bradford, M. M. 1976. Anal. Biochem. 72: 248-245), usando albúmina de suero bovino (BSA) como un patrón. Se analizaron diferentes fracciones por una electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico 12,5 % (SDS-PAGE) (Laemmli, U. K. 1970. Nature 227: 680-685). La actividad RNasa se determinó como se ha descrito previamente (Roiz y Shoseyov 1995, Int. J. Plant Sci. 156: 37-41).

La RNasa B1 purificada se desglucosiló enzimáticamente de acuerdo con el procedimiento descrito por Broothaerts y col. (Broothaerts, W. P. y col. 1991. Sex. Plant Reprod. 4: 258-266). La enzima se mezcló con SDS 0,5 % (p/v) y β -mercaptoetanol 5 % (p/v) y se calentó a 100 °C durante 5 minutos. Una vez enfriada, la mezcla de reacción se diluyó 2,5 veces con un tampón que contenía fosfato sódico 50 mM pH 7,5, EDTA 25 mM, Tritón X-100 1 % (p/v) y azida sódica 0,02 % (p/v). Se añadió péptido-N-glicosidasa F (PNGasa F, Boehringer-Mannheim) a una concentración final de 20 unidades $\cdot\text{ml}^{-1}$ y se realizó incubación durante una noche a 37 °C. La muestra se mezcló después con tampón de aplicación de muestras, se calentó a 100 °C durante 5 minutos y se analizó por SDS-PAGE usando un gel al 12,5 % gel.

Ensayos de RNasa:

Se determinaron las condiciones óptimas para actividad RNasa de acuerdo con un procedimiento modificado de Brown y Ho (Brown, P. H. y Ho, T.H.D. 1986 Plant Physiol. 82: 801-806), usando un intervalo de temperaturas de 20 a 100 °C a incrementos de 10 °C, y un intervalo de pH de 2,5 a 7 a incrementos de 0,5 unidades de pH, establecido usando tampones de fosfato-citrato 50 y 12 mM. Se añadieron muestras de 10 μl cada una a 490 μl de tampón helado, que contenían ARN de levadura 4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Sigma). Se usó la mitad de cada muestra como un blanco añadiendo inmediatamente una solución de parada que contenía 50 μl de uranil sulfato 0,75 % (p/v) en ácido perclórico 25 % (p/v). La mitad restante se incubó durante 10 minutos, después de lo cual se añadieron 50 μl de solución de parada a cada una. Después de centrifugación a 15.000 X g durante 5 minutos, el sobrenadante se diluyó 20 veces con agua destilada y se determinó la absorbancia a 260 nm. Se determinó una unidad de actividad RNasa como la cantidad de enzima que libera nucleótidos solubles a una velocidad de una $\text{U}\cdot\text{A}_{260\text{ nm}}$ por minuto.

La RNasa B1 se visualizó por una actividad en gel, como se ha descrito previamente (Roiz y Shoseyov, 1995, Int. J. Plant Scizz. 156: 37-41). Se renaturalizó un gel de SDS que contenía RNasa B1 lavando dos veces durante 15 minutos cada una con tampón de acetato 20 mM a pH 3,5 que contenía 25 % (v/v) de isopropanol y después dos veces durante 15 minutos cada una con tampón solamente. El gel renaturalizado que contenía la RNasa B-1 se puso sobre una placa que contenía ARN 0,1 % y agarosa 0,8 % en tampón de acetato 20 mM y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después el gel se retiró y la placa de agarosa se tiñó con azul de toluidina 0,02 % (p/v) en agua para visualizar la actividad RNasa.

El efecto de RNasa B1 en el crecimiento del tubo polínico

Se germinó polen de melocotón cv. Almog *in vitro* en cultivo líquido, como se ha descrito previamente (Roiz y Shoseyov, 1995, Int. J. Plant Sci. 156: 37-41). Los granos de polen se suspendieron en alícuotas que contenían 100 μl de sacarosa al 15 % (p/v), ácido bórico 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sulfato magnésico 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, nitrato cálcico 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y diferentes concentraciones de RNasa B1. Después de incubación durante una noche a 25 °C en una cámara oscura, se registró el porcentaje de germinación. Se examinó la longitud del tubo polínico con un micrómetro ocular.

El efecto de tratamiento con RNasa B1 en el crecimiento del tubo polínico también se ensayó *in vivo*. Se pulverizaron las flores intactas de melocotón y en mandarina (*Citrus reticulata*, Blanco cv. Murcott) en las etapas tempranas de antesis con 100 unidades $\cdot\text{ml}^{-1}$ de RNasa B1 en tampón de citrato 20 mM a pH 3,5. En cada especie se pulverizaron flores adicionales en la misma etapa, en diferentes ramas, solamente con tampón o permanecieron sin tratamiento como controles. Después de la exposición a polinización abierta durante 48 horas, los estilos se fijaron en ácido acético en etanol 3:1 (en volumen) durante 24 horas, se lavaron con agua destilada y se incluyeron

durante una noche en hidróxido sódico 8 M. Después de lavado exhaustivo en agua destilada, los estilos se cortaron longitudinalmente, se sumergieron cada uno en una gota de azul de anilina 0,1 % (p/v) en fosfato potásico 0,1 M en un portaobjetos y se trituraron cuidadosamente con un cubreobjetos de vidrio. Los tubos polínicos se observaron por microscopia de epifluorescencia (Olympus BX40 equipado con cubo de WIB).

5 **El efecto de RNasa B1 en la formación de frutos:**

Se realizaron experimentos de campo en nectarina (*Prunus persica* var. Nectarina Fantasia). Se pulverizaron ramas de 30-40 cm de largo, que portaban aproximadamente 10 % de flores abiertas, con diferentes concentraciones de RNasa B1 en tampón de citrato 20 mM pH 3,5 y Tritón-X 100 0,025 %. Las ramas no tratadas, y las ramas a las que se pulverizó solamente tampón y tritón-X 100 sirvieron como controles. Las ramas se pulverizaron a intervalos de 2 a 3 días durante el periodo de florescencia (14 días). Un mes después, se examinó el número de frutos por rama. Para ensayo de viabilidad, las semillas se cortaron longitudinalmente a través del embrión y se sumergieron en cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio 1 % en agua durante 4 horas a 20 °C en una habitación oscura. La tinción roja indicó tejidos viables.

Resultados experimentales

15 **Purificación y caracterización de RNasa B1:**

A. niger cultivada en cultivo líquido produjo cantidades considerables de RNasa B1 extracelular. Se descubrió que una temperatura de 60 °C y un pH de 3,5 eran óptimos para actividad RNasa, y se adoptaron como las condiciones convencionales para ensayos de RNasa posteriores.

La purificación de RNasa B1 incluyó tres etapas (Tabla 3). En una primera etapa un filtrado en bruto contenía 1000 unidades·ml⁻¹ y se obtuvieron 0,05 mg·ml⁻¹ de proteína. El filtrado en bruto se pasó a través de una columna EMD-TMAE y las fracciones activas agrupadas (Figura 1, gráfica A) contenían proteína 0,1 mg·ml⁻¹, con una actividad RNasa de 40.000 unidades·ml⁻¹. En la etapa final, las fracciones agrupadas se pasaron a través de una columna MONO-Q y la fracción de RNasa activa se eluyó (Figura 1, gráfica B). Esta fracción contenía una concentración de proteínas de 1,05 mg·ml⁻¹ y actividad RNasa de 543.000 unidades·ml⁻¹. Se observaron dos bandas proteicas principales, de 40 y 32 kDa, después de SDS-PAGE de la fracción de RNasa B1 purificada (Figura 2). Un gel de actividad RNasa mostró bandas activas correspondientes a las proteínas de 32 y 40 kDa. Cuando se sometió a PNGasa F, apareció una banda proteica única a 29 kDa. Se conservó actividad RNasa después de digestión con PNGasa (no mostrado).

TABLA 3

Etapa de purificación	Unidades totales	Concentración proteica (mg/ml)	Recuperación (%)	Actividad específica (unidades/mg de proteína)
Filtrado en bruto	0	0,05	100	20.000
Columna EMD-TMAE	0	0,1	56	400.000
Columna MONO-Q	652.200	1,05	32,6	517.143

30 **El efecto de RNasa B1 en tubos polínicos y formación de frutos:**

En experimentos *in vitro*, 75 % de los granos de polen de control germinaron y los tubos polínicos alcanzaron aproximadamente 0,5 mM de longitud. La adición de RNasa B1 al medio de crecimiento redujo el porcentaje de germinación y la longitud de los tubos polínicos, de una manera sensible a dosis (Figura 3). La RNasa B1 tuvo un efecto inhibitorio pronunciado, 50 unidades·ml⁻¹, que representan 0,1 µg·ml⁻¹ de proteína, fueron letales, mientras que 125 µg·ml⁻¹ de BSA redujo solamente la mitad de la germinabilidad del polen y crecimiento del tubo.

In vivo, se observó el crecimiento de tubos polínicos de control de melocotón a través del tejido estigmático dirigido hacia el estilo 48 horas después de la polinización (Figura 4a). Se observó un efecto similar en estilos tratados solamente con tampón. Por el contrario, los granos de polen germinados en estigmas tratados con RNasa B1 produjeron tubos polínicos cortos, que parecía que carecían de ninguna orientación del crecimiento, y no penetraron en el tejido estilar (Figura 4b). En mandarinas solamente una pequeña parte del tejido estigmático, el diámetro del cual era de 2-3 mm, se capturó por el campo de visión del microscopio. Por lo tanto, solamente se observaron unos pocos tubos polínicos, como se muestra en la Figura 5. Sin embargo, la diferencia entre el crecimiento normal de los tubos polínicos de control (Figura 5a) y el crecimiento irregular de los tubos polínicos tratados con RNasa (Figura 5b), fue claramente evidente.

45 En nectarina cv. Fantasia, RNasa B1 produjo una reducción de la formación de frutos (Tabla 4). En ramas que permanecieron sin tratar o pulverizadas con tampón con tritón X-100, la formación de frutos fue del 48,3 % y del 36,3 % respectivamente. Parece que el tampón de pH bajo tuvo algún efecto inhibitorio en la formación de frutos, sin

embargo las ramas tratadas con 500 y 1000 unidades·ml⁻¹ de RNasa B1 formaron un 23,3 % y 18,4 % de frutos, respectivamente, lo que indica un efecto de aclaración significativa de la RNasa, de una manera dependiente de dosis.

TABLA 4

Tratamiento	Flores (número total)	Formación de frutos (%)
Control no tratado	169	48,3 a*
Tampón de control	143	36,3 ab
RNasa B1 500 unidades/ml	148	23,3 bc
RNasa B1 1000 unidades/ml	106	18,4 c

* Los valores que no comparten una letra común son significativamente diferentes a P = 0,05.

- 5 En ramas tratadas con RNasa B1 se observaron muchos frutos no desarrollados. Los ensayos de viabilidad mostraron que en las flores de control (no tratadas o pulverizadas solamente con tampón), los tejidos embrionarios se tiñeron de rojo, (Figura 6a), mientras que los tejidos de embriones desarrollados en las flores tratadas con RNasa, se tiñeron de marrón, lo que es indicativo de necrosis (Figura 6b).

10 Se purificó RNasa extracelular B1 de *Aspergillus niger* (RNasa B1) hasta homogeneidad. Se descubrió que contenía dos isoformas de glicoproteínas de 32 y 40 kDa, que compartían un núcleo proteico de 29 kDa. La actividad RNasa óptima se observó a una temperatura de 60 °C y un pH de 3,5. En melocotón (*Prunus persica* cv. Almog) y mandarina (*Citrus reticulata*, Blanco cv. Murcott) la enzima inhibió la germinación del polen y el crecimiento del tubo *in vitro* así como *in vivo*. En experimentos de campo, la RNasa provocó una reducción de la formación de fruto de nectarina (*Prunus persica* var. nectarina Fantasia) e inhibió el desarrollo embrionario normal.

15 Ejemplo 2

La inhibición de germinación del polen y crecimiento del tubo por T2-RNasa está mediada a través de la interacción con actina

La inhibición de la germinación del polen y el crecimiento del tubo por RNasa está bien reconocida, aunque el mecanismo por el que esta enzima interfiere con el proceso de elongación aún no está claro. Como tal, este estudio se plantea descifrar el papel de la RNasa B1 en la interacción con el proceso de elongación de tubos polínicos.

Materiales y procedimientos experimentales:

El efecto de RNasa B1 en el crecimiento de tubos polínicos:

25 Se permitió la dehiscencia de anteras de lirio (*Lilium grandiflorum* L. cv. Osnat) durante 24 horas a temperatura ambiente y después se usaron nuevas o se almacenaron a -20 °C. Se produjo RNasa B1 y se purificó de filtrado de medio de crecimiento de *Aspergillus niger* como se describe en el Ejemplo 1. El polen se germinó *in vitro* en cultivos acuosos de 100 µl cada uno, que contenían sacarosa al 7 %, CaNO₃ 1,27 mM, H₃BO₃ 0,16 mM, K₂NO₃ 1 mM y KH₂PO₄ 3 mM en agua (Yokota y Shimmen 1994). Algunos cultivos se complementaron con RNasa B1 que tenía 100 unidades/ml de actividad RNasa a una concentración final de 16 µg/ml. Los cultivos adicionales se complementaron con RNasa que se había hervido previamente durante 30 minutos lo que produjo la pérdida del 50 % de la actividad, o con RNasa sometida a autoclave que carecía de ninguna actividad catalítica. Después de 2 horas de incubación a 30 25 °C en oscuridad, se midió la longitud del tubo polínico bajo el micrómetro ocular microscópico. Los tubos polínicos se tiñeron con IKI (I₂ 0,3 % y KI 1,5 % en agua) para detectar cuerpos de almidón.

35 Se transfirieron tubos polínicos de 1 hora que se extendían de forma activa a celdas de vidrio en el estadio microscópico. El patrón del crecimiento de los tubos polínicos y movimiento de los orgánulos se registró en video como se modificó por Heslop-Harrison y Heslop-Harrison (Heslop-Harrison, J. y Heslop-Harrison, Y. 1990. Sex Plant Reprod. 3: 187-194), usando presentador de video Applitec MSV-800. Se capturaron imágenes a 0,8 fotogramas/segundo durante 8 segundos por un capturador de fotogramas Scion LG-3 y después se digitalizaron e integraron por el software NIH *image*. Las fotografías se procesaron usando los software Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA) y Power-Point (Microsoft Co.).

El efecto de RNasa en filamentos de actina de tubos polínicos:

40 Se germinó polen *in vitro* en cultivos acuosos con o sin RNasa. Después de la incubación durante una noche, los tubos polínicos se sedimentaron suavemente y el medio de crecimiento se reemplazó con faloidina marcada con tetrametilrodamina B isotiocianato (TRITC) 10⁻⁶ M (Sigma) en tampón PBST (NaCl 150 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM y Tween-20 0,02 %). Para observaciones *in vivo*, se emascularon flores de lirio cv. Stargazer en

el momento de aparición de la antesis y se inyectaron 0,5 ml de un medio de crecimiento que contenía RNasa 10 unidades/ml a través del estigma al canal estilar. Las flores en las que se inyectó medio de crecimiento sin RNasa se usaron como un control. Los líquidos se absorbieron en el tejido estilar durante 5 horas a 25 °C, después de lo cual los estigmas se polinizaron a mano por polen de lirio cv. Osnat. Después de 48 horas de incubación a 25 °C, cada pistilo se cortó longitudinalmente y los tubos polínicos se escindieron cuidadosamente y se retiraron a solución de TRITC-TBST y se incubaron durante 1 hora. La incisión en el estigma no afectó a los tubos polínicos, puesto que sus protoplastos vitales se localizaban en la parte distal, protegida por tapones callosos. En los experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* los tubos polínicos teñidos se aclararon en TBS (TBST sin Tween-20), se situaron en un portaobjetos de vidrio y se observaron con un microscopio óptico epifluorescente (Olympus BX40 equipado con lámpara de mercurio USH-102D).

Unión de actina con RNasa B1:

La interacción entre RNasa B1 y actina se cuantificó modificando a partir de Simm (Simm, F. C. y col., 1987. Eur. J. Biochem. 166: 49-54). Se polimerizó actina globu (G-) de músculo de conejo (Sigma Co.) a actina filamentosa (F-) en Tampón F (Tris 10 mM pH 8, ATP 0,1 mM, CaCl₂ 0,2 mM, KCL 0,1 M y MgCl₂ 2 mM) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron muestras de 50 µl que contenían cada una F-actina 30 µM durante una noche a 4 °C con RNasa B1 1-33 µM. Como control, cada concentración de RNasa se incubó con tampón F solamente. Las muestras se centrifugaron a 15.000 g durante 40 minutos y se determinó la actividad RNasa del sobrenadante (Roiz, L., Goren, R. y Shoseyov, O. 1995, Physiol. Plant. 94: 585-590.).

Tinción de plata por inmunooro de RNasa B1 en tubos polínicos:

Se usó tinción de plata por inmunooro (IGSS) para detectar unión de RNasa con tubos polínicos de lirio. Se indujeron anticuerpos policlonales contra RNasa B1 en conejo (Aminolab). Se fijaron tubos polínicos de lirio de 2 horas *in vitro* durante una noche en glutaraldehído 2,5 % en PBST a 4 °C. Los tubos polínicos se lavaron durante 1 hora en PBST, se bloquearon durante 1 hora en PBST que contenía BSA 1 % y leche desnatada 2 % y se incubó durante 1 hora en anti-RNasa B1, diluido 1:500 en PBST. Se usó suero preinmune de conejo (PIS) como control. Los tubos polínicos se lavaron tres veces, 10 minutos cada uno, en PBST y después se incubaron durante 1 hora en IgG anticonejo de cabra conjugada con partículas de oro de 5 nM, diluidas 1:100 en PBST. Después de dos lavados de 10 minutos en PBST y un lavado de 10 minutos en agua, se usó un kit de tinción con plata (BioCell Research Laboratories) para el desarrollo final de la reacción. Los tubos polínicos se empaparon con las soluciones del kit combinadas durante 10-15 minutos, se lavaron en agua destilada en exceso y se observaron en un microscopio óptico (Olympus BX40).

Resultados experimentales

Una muestra de control de tubos polínicos de lirio, germinados *in vitro* en un medio de crecimiento sin RNasa, alcanzó aproximadamente 300 µm de longitud (Figura 7). Los cultivos que se trataron con RNasa en las mismas condiciones, alcanzaron solamente 160 µm de longitud. Hervir o someter autoclave la RNasa produjo tubos polínicos de 130 y 170 µm de longitud, respectivamente. Las diferencias entre los tres grupos tratados con RNasa de los tubos polínicos se consideraron insignificantes.

La tinción de almidón mostró que se observaron amiloplastos de la muestra de control propagándose a lo largo del tubo polínico, excepto en la zona de la punta (Figura 8a). Por otro lado, los cuerpos teñidos con IKI de tubos polínicos tratados con RNasa se acumularon en la zona de la punta (Figura 8b).

Las imágenes de video integrado de tubos polínicos que se extendían activamente presentaron las líneas de flujo citoplásmico (Figuras 9a y 9b). En la muestra de control era más habitual un movimiento longitudinal continuo, como lo era el flujo acropetal en la periferia del tubo y flujo basipetal en el centro, lo que formaba un patrón de "fuente inversa" debajo de la zona de la punta (Figura 9a). La zona de la punta en sí misma estaba ocupada por cuerpos mucho más pequeños, principalmente partículas P, cuyo patrón de movimiento apenas se observó. En tubos polínicos inhibidos con RNasa la punta parecía hinchada, con partículas de almidón y lípidos bien visibles que alcanzaban la zona de la punta (Figura 9b). No pudo detectarse movimiento continuo, pero en su lugar imágenes irregulares extendidas indicaron que los cuerpos citoplásmicos rotaban de forma aleatoria.

El efecto de la RNasa en la distribución de los filamentos de actina se examinó en tubos polínicos *in vitro* de 1 hora e *in vivo* de 48 horas. Los tubos polínicos *in vivo* alcanzaron aproximadamente 3-4 cm de longitud, y su tinción con TRITC-faloidina fue más intensiva que en los tubos *in vitro*. Sin embargo, el modo del efecto de la RNasa fue similar en ambos experimentos. En el control, los microfilamentos de actina se ensamblaron longitudinalmente a lo largo del eje del tubo, formando una red fina en la zona de la punta (Figura 10a). Por otro lado, en tubos polínicos tratados con RNasa se acumularon masas de actina en la pared celular de la punta (Figura 10b).

La interacción entre RNasa B1 y actina se cuantificó usando análisis de Scatchard. En el experimento de actina-RNasa B1, una línea de regresión, que intersectaba con la abscisa a 0,45 (Figura 11) indicó que la relación molar de RNasa:actina era de 0,45, lo que implica que se unen dos moléculas de actina a cada molécula de RNasa.

Se preparó polen germinado en presencia de RNasa B1 para microscopía óptica y se determinó la localización de RNasa por IGSS, usando anticuerpos anti-RNasa (Figuras 12a-c). En tubos polínicos cultivados sin RNasa (Figura 12a) o con RNasa pero tratados con PIS (Figura 12b), la superficie externa de la pared celular estaba desprovista de tinción de plata. Por otro lado, en el tubo polínico tratado con RNasa B1, apareció una tinción de plata por inmunoro evidente, que se acumulaba sobre la zona de la punta (Figura 12c).

En este estudio la germinación del polen y la elongación del tubo de Lirio (*Lilium grandiflorum*) se inhibieron específicamente por RNasa B1 de *A. niger*. La RNasa hervida o sometida a autoclave, que carecía de la mayor parte de la actividad catalítica original, mostró un efecto inhibitor similar. Los resultados demuestran que la RNasa de *A. niger* es una proteína de unión a actina que tiene un efecto inhibitor en la elongación del tubo polínico. Esta unión que no está relacionada con la actividad catalítica de RNasa B1 deforma el ordenamiento de los filamentos de actina del tubo polínico para interrumpir de este modo la corriente citoplásmica.

Ejemplo 3

El efecto de RNasa B1 en células de cáncer de colon humanas

Puesto que la actividad de unión a actina descubierta para RNasa B1 en tubos polínicos apuntó a una posible actividad citotóxica se decidió examinar el efecto citotóxico de RNasa B1 en células de cáncer de colon humanas.

Materiales y procedimientos y resultados experimentales

Cultivo celular:

Todos los experimentos se realizaron *in vitro*. Se cultivaron células de adenocarcinoma de colon humano (HT29) en medio DMEM (Biological Industries, Bet Haemek), complementado con suero de ternero fetal 10 %, glutamina 1 % y solución de Antibiótico-Antimicótico 10 % (Biolab). Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ 5 %. Se realizaron soluciones de RNasa B1 en tampón PBS, pH 6,8.

Ensayo de viabilidad celular preliminar:

Las células se incubaron con matraces de 50 ml. Cada matraz contenía 2×10^5 células en 7 ml de medio, en ausencia o presencia de concentraciones diferentes (10^{-8} - 10^{-6} M) de RNasa B1. Las células se cultivaron durante 48 horas o 72 horas, y después se contaron diferencialmente las células viables y las no viables usando tinción con azul de tripano.

En todos los tratamientos el número total de células cultivadas durante 72 horas ($55-60 \times 10^5$), excedió aproximadamente dos veces el número de células obtenido después de 48 horas de cultivo ($25-30 \times 10^5$) (Figura 13a). La presencia de RNasa B1 en el medio de crecimiento no tuvo un efecto significativo en el crecimiento celular. Sin embargo, se descubrió un efecto pequeño pero significativo de la RNasa B1 en el número de células muertas tanto a 48 horas como a 72 horas de incubación (Figura 13b).

Ensayo de clonogenicidad I:

La supervivencia a largo plazo de células tumorales se caracteriza por su capacidad para dividirse y producir clones. Las células se preincubaron durante 48 horas en medio de crecimiento que contenía RNasa B1 10^{-6} M, después se tripsinizaron, se lavaron y se resuspendieron en medio de crecimiento sin RNasa B1. Antes de sembrar en placas de microtitulación de 96 pocillos, las células se diluyeron a diluciones en serie 5 veces que variaban entre 50 y 10^5 células en cada pocillo (200 µl). Las placas se incubaron durante 14 días en las condiciones descritas anteriormente, sin añadir medio de crecimiento nuevo después de lo cual las colonias se fijaron y se tiñeron con azul de metileno. Las células clonogénicas en cada pocillo se numeraron después de visualización de los clones. Las células de control se trataron como anteriormente, pero preincubadas durante las primeras 48 horas en medio sin RNasa B1.

En ambos tratamientos se observó un número similar de colonias en pocillos en los que se sembraron 100 células (Figura 14). El efecto citotóxico de la RNasa B1 apareció en pocillos que contenían densidades mayores de células. En pocillos en los que se sembraron 500 células cada uno, las células de control y las tratadas con RNasa B1 produjeron 180 y 100 colonias por pocillo, respectivamente. Además, en pocillos en los que se sembraron 1000 células cada uno, las células tratadas con RNasa B1 formaron aproximadamente 250 colonias por pocillo, mientras que las células de control formaron numerosas colonias que se fusionaron en una capa continua, que por tanto no se pudieron contar y se ilustran en la Figura 14. Las células sembradas a densidades mayores no sobrevivieron el cultivo sin cambio de medio.

Ensayo de clonogenicidad II:

Se examinó la capacidad de las células tumorales para proliferar y colonizar en exposición corta frente a continua a RNasa B1. El experimento se realizó como se describe en ensayo de Clonogenicidad I usando (i) células de control, (ii) células preincubadas con medio que contenía RNasa B1 10^{-6} M y a las que después se permitió colonizar en medio de crecimiento sin RNasa B1, y (iii) células preincubadas como en (ii) y después incubadas durante el ensayo

de colonización en medio de crecimiento que contenía RNasa B1 10^{-6} M. En estos experimentos las densidades iniciales variaban entre 250-1000 células por pocillo y el periodo de colonización fue de 7 días.

El periodo de incubación más corto usado en este experimento (7 días) en comparación con una preincubación de 14 días dio como resultado colonias no desactivadas, que podían distinguirse incluso en pocillos que contenían altas densidades de células. En todas las densidades, una preincubación de 48 horas en RNasa B1 condujo a una reducción del 20-30 % en la capacidad de las células para colonizar, en comparación con el control (Figura 15). Sin embargo en cada densidad una exposición continua a RNasa B1 condujo a una reducción drástica del 90 % en clonogenicidad. Las Figuras 16a-c muestran que las células tratadas con RNasa B1 continuas (Figura 16c) eran menores y menos teñibles que las células que se preincubaron durante 48 horas en RNasa B1 (Figura 16b) o las células de control (Figura 16a). Este resultado indica que RNasa B1 afectaba a la velocidad de crecimiento de las colonias.

Por lo tanto como se muestra claramente a partir de los resultados presentados en el presente documento la RNasa B1 de *A. niger* tiene un claro efecto citotóxico en células cancerosas HT29 de adenocarcinoma humano. El efecto citotóxico de RNasa B1 se expresa mediante reducción de la clonogenicidad celular, en lugar de reducción de la viabilidad celular. Es posible que la RNasa B1 tenga un efecto a largo plazo en las células tumorales. La RNasa B1 provoca una reducción en la velocidad de crecimiento de las colonias en comparación con el control, lo que indica que puede afectar a la capacidad de las células para proliferar.

Ejemplo 4

El efecto in vivo de RNasa B1 en el desarrollo tumoral en un modelo de rata

Para estudiar adicionalmente el efecto antineoplásico de RNasa B1, se realizó un experimento *in vivo* en ratas.

Materiales y procedimientos experimentales

Se dividieron ratas macho de 4 semanas de edad derivadas de Charles-River en grupos de 6. En algunos grupos, se indujo que las ratas desarrollaran cáncer de colon por cinco inyecciones semanales de dimetilhidrazina (DMH). En este experimento, se examinaron dos modos de administración de RNasa B1. La RNasa B1 se aplicó directamente al colon por microbombas osmóticas, o se proporcionó por vía oral usando microcápsulas con revestimiento entérico. El conjunto completo de tratamientos que recibió cada grupo de ratas se describe por el esquema de la Figura 1. Durante el experimento, las ratas se pesaron semanalmente para supervisar el efecto de DMH y/o RNasa B1 en su velocidad de crecimiento. En grupos tratados con RNasa B1 se recogieron heces semanalmente de cada jaula y se secaron a 60 °C. Se molió una muestra de heces secas de 250 mg y se volvió a disolver en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de la centrifugación, se examinó la actividad RNasa en la solución superior como se describe en Roiz y col. (Roiz, L. y col., J. Amer. Soc. Hort. Sci. 125(1): 9-14.2000).

Administración de RNasa B1 al colon mediante microbombas osmóticas:

Se cargó RNasa B1 en microbombas osmóticas (ALZET). Las bombas se implantaron por vía subcutánea en el abdomen de las ratas. Las bombas osmóticas permitieron una liberación constante de RNasa B1 directamente al colon mediante un catéter, a una concentración calculada de 10^{-6} M en el colon durante al menos 6 semanas, suponiendo que el colon de la rata es de aproximadamente 4 ml de volumen. Las ratas se trataron como sigue: en las ratas de un grupo se implantaron bombas que contenían RNasa B1 "viva" (RNasa B1), que tenía actividad RNasa completa. En ratas de un segundo grupo se implantaron bombas que contenían RNasa B1 inactivada por autoclave (I-RNasa B1), que carecía de ninguna actividad RNasa. Mientras tanto, en las ratas de un tercer grupo se implantaron bombas que contenían PBS, que se usó como el vehículo de RNasa B1 en los dos primeros grupos, y actuaron como controles.

Para examinar un posible efecto preventivo de RNasa B1, ratas tratadas con DMH seleccionadas recibieron RNasa B1 1-9 semanas después de la primera inyección con DMH. Después, las ratas se sacrificaron y sus cólores se escindieron y se lavaron con PBS y después con PBS que contenía ditiotreitól 0,1 M (DTT). Los cólores se abrieron a continuación longitudinalmente y se fijaron durante al menos 1 hora en formaldehído 4 % en PBS sobre un papel de filtro. Después de tinción con azul de metileno 0,025 % en PBS, la mucosa del colon se observó mediante un microscopio con ampliación baja con respecto a focos de criptas aberrantes (ACF). Los ACF se contaron en el colon distal (5 cm).

Para examinar un efecto terapéutico de RNasa B1, el resto de las ratas recibieron RNasa B1 de 12 a 17 semanas después de la primera inyección de DMH. Los cólores se escindieron y se fijaron como se ha descrito anteriormente y los tumores se contaron y se midieron. Para exámenes histopatológicos, cada tumor se incluyó en parafina. Se tiñeron secciones finas (10 μ m) y se evaluó el grado de malignidad.

Administración oral de RNasa B1:

Preparación de microcápsulas:

Se prepararon microcápsulas con un procedimiento modificado descrito por Lin y col. (Lin J. J., y col., 1994, Biochem. Biophys. Res. Commun. 14; 204(1): 156-62). Se molió bien una mezcla de 0,6 gramos de RNasa B1 liofilizada y 2,4 gramos de glucosa mediante un mortero. El polvo fino se vertió en un vaso de precipitados de 1 l que contenía 200 ml de parafina líquida y 2 ml de Span-80 y se agitó a 600 rpm durante 20 minutos. Se añadió cuidadosamente solución de acetona-etanol- celulosa acetato ftalato (CAP) a la mezcla de agitación anterior (3,2 gramos de CAP en 40 ml de acetona:etanol al 95 % 9:1) y se dejó agitando durante 2 horas adicionales en una campana, para retirar trazas de acetona. Las microcápsulas se endurecieron añadiendo 30 ml de éter y se secaron en papel de filtro usando embudo Buchner y se retiraron trazas de parafina líquida por dos lavados adicionales con 30 ml de éter. Después se dejaron secar las microcápsulas durante una noche y se pasaron a través de una malla fina. La mayoría de las microcápsulas estaban entre 200 y 500 μm .

En un experimento preliminar (Figura 18), se descubrió que las microcápsulas de CAP eran insolubles en pH ácido, lo que representa el ambiente del estómago. Sin embargo, después de 1 hora en pH alcalino se consiguió la actividad RNasa máxima, lo que indica que las microcápsulas podrían fácilmente liberar su contenido en los intestinos.

15 **Administración oral de las microcápsulas de RNasa B1:**

Las microcápsulas que contenían RNasa B1 o glucosa como placebo, se mezclaron con piensos Purina molidos. Cada rata tratada con RNasa B1 recibió una dosis diaria de 1,6 mg de RNasa B1, para obtener una concentración final de 10^{-5} M en el colon. Los detalles experimentales para administración oral fueron como se ha descrito anteriormente para la administración de microbombas, excepto para una terminación retardada (11 semanas) evaluando a la vez el efecto preventivo de RNasa B1 (Figura 17).

Resultados experimentales

El efecto de los diferentes tratamientos en la velocidad de crecimiento de las ratas:

El peso inicial de las ratas fue de aproximadamente 200 gramos. El experimento terminó en un momento diferente para cada tratamiento, como se ha descrito anteriormente. En general, las ratas alcanzaron un peso corporal final de aproximadamente 400-500 gramos, sin diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Figuras 19a-d). Sin embargo, los grupos tratados con DMH mostraron una ligera reducción de peso corporal en comparación con grupos tratados con RNasa B1, en presencia o ausencia de DMH.

Actividad RNasa en heces de rata:

Las Figuras 20a-c muestran cambios de la actividad RNasa en heces de ratas a las que se habían implantado bombas osmóticas que contenían RNasa B1, I-RNasa B1 o PBS de un modo preventivo (Figura 1) durante 8 semanas. En ratas tratadas con RNasa B1 (Figura 20a) la actividad RNasa en las heces fue 5 veces mayor que en ratas tratadas con I-RNasa B1 (Figura 20b) o con PBS (Figura 20c). Esta actividad se mantuvo alta durante 5 semanas y después se redujo gradualmente, a medida que se agotaba el depósito de RNasa B1 en las bombas. Se detectó una actividad RNasa endógena basal en heces de los dos grupos posteriores.

Se observó un patrón similar en ratas alimentadas con RNasa B1 microencapsulada, pero se detectó una actividad RNasa 8 veces mayor en comparación con ratas alimentadas con microcápsulas que contenían solamente glucosa (Figura 21). En este experimento, la reducción gradual de actividad RNasa puede explicarse como resultado del aumento del peso corporal de las ratas y, como consecuencia, del volumen colónico.

El efecto de RNasa B1 como agente preventivo

Las ratas con bomba implantada se sacrificaron después de 8 semanas, desde que se observó infección en los sitios de la bomba. En este estadio solamente eran evidentes ACF. Los ACF son biomarcadores sustitutos de cambios carcinogénicos en el colon de la rata durante la fase de inicio de la carcinogénesis. Las células caliciformes en las criptas se hacen mayores y se tiñen de forma intensa en comparación con las células normales de la mucosa. Los recuentos de ACF se redujeron drásticamente debido a tratamientos con RNasa B1 o I-RNasa B1 (Figura 22). No se observó efecto perjudicial en la mucosa del colon en ratas tratadas con RNasa B1 o I-RNasa B1 en ausencia de DMH.

En las ratas alimentadas con RNasa B1 microencapsulada, el experimento continuó durante 11 semanas después de la primera administración de DMH. En ese momento, estaban presentes tanto tumores como ACF. La RNasa B1 provocó una reducción del número de tumores por colon (Figura 23a), del tamaño tumoral (Figura 23b) así como del número de ACF (Figura 23c) en comparación con el control.

Además, se observó una diversidad de color de los tumores de colon; los tumores rojos que tenían aporte sanguíneo intenso (Figura 24a), tumores blancos casi desprovistos de vasos sanguíneos (Figura 24b), y tumores "rosa" con solamente pocos vasos sanguíneos (Figura 24c). En las ratas tratadas con glucosa todos los tumores eran rojos. Por otro lado, en ratas tratadas con RNasa B1 se observó una reducción significativa del número de tumores rojizos (Figura 24d); el 10 % y el 50 % de los tumores eran rosas y blancos, respectivamente. Estos resultados indican

claramente un efecto antiangiogénico de RNasa B1.

Los tumores también pudieron distinguirse por parámetros histopatológicos, como benignos o malignos. Un tumor benigno denominado adenoma (Figura 25a) puede definirse por una capa mucosa propagada, y en ocasiones por desarrollo de adenopapiloma, sin embargo la submucosa está intacta y bien definida con respecto a las otras capas del colon. En un tumor maligno, denominado adenocarcinoma, las células de la mucosa penetran por debajo de la submucosa y con el tiempo conducen a pérdida de ordenamiento tisular (Figura 25b y 25c). Los exámenes de la distribución de los diferentes tipos de tumores en ratas tratadas preventivamente con glucosa o RNasa B1 mostraron que la RNasa B1 redujo claramente el grado de malignidad (Figura 9d).

El efecto de RNasa B1 como un agente terapéutico:

En ambos modos de aplicación, directamente por bombas osmóticas o por vía oral, los tumores bien desarrollados se expusieron a RNasa B1 durante las semanas 12-17 del experimento. En ratas tratadas con bombas osmóticas, la RNasa B1 provocó una reducción del número de tumores por colon (Figura 26a). El efecto inhibitorio, aproximadamente 50 % en relación con el control, fue más significativo en ratas tratadas con I-RNasa B1.

La RNasa B1 también afectó al crecimiento tumoral, como se demostró por la distribución de tamaños (Figura 26b). En general, la mayoría de los tumores tuvieron un diámetro de 3-5 mm, sin embargo en ratas tratadas con PBS aparecieron tumores excepcionalmente grandes, además de 9-12 mm. Este resultado implica que la RNasa B1 inhibe o detiene el desarrollo de tumores preexistentes. No obstante, no se observaron diferencias significativas entre los efectos de RNasa B1 e I-RNasa B1.

Como en el experimento de efecto preventivo de RNasa B1, el patrón de angiogénesis también se vio afectado por RNasa B1 aplicada mediante bombas osmóticas (Figura 26c). En ratas tratadas con PBS la mayoría de los tumores, aproximadamente 80 %, eran de color rojo. Por el contrario, en ratas tratadas tanto con RNasa B1 como con I-RNasa B1 solamente el 30 % de los tumores eran rojos, mientras que los otros eran rosas o blancos. Parece que la RNasa B1 reduce la angiogénesis también en tumores preexistentes.

En ratas alimentadas con RNasa B1 encapsulada, el efecto del tratamiento fue menos significativo que el obtenido por bombas osmóticas (Figuras 27a-c). Este resultado se explica asumiendo que una proporción muy pequeña de la proteína alcanza el colon. Como se ha mencionado anteriormente, las microcápsulas pasan de hecho al estómago, pero aún tienen una larga ruta a través del intestino delgado y el ciego. Se realizó por lo tanto un experimento para ensayar esta hipótesis usando microcápsulas de CAP cargadas con una proteína fluorescente y proporcionadas a ratas. Las ratas se sacrificaron después de seis horas y el contenido de su tracto gastrointestinal se observó en un microscopio fluorescente. Se descubrió que en el duodeno las microcápsulas comenzaron a disolverse. La disolución se procesó adicionalmente en el íleon y el yeyuno. Cuando las microcápsulas alcanzaron el ciego, la mayor parte de la fluorescencia se difundió al contenido del ciego. Puesto que las microcápsulas estaban dañadas, el efecto de RNasa B1 puede reducirse debido a proteasas presentes en el intestino y el ciego.

A pesar del hecho de que la RNasa B1 administrada por vía oral no redujo el número y tamaño de tumores preexistentes, la distribución entre tipos de color de los tumores se vio afectada ligeramente (Figura 27c). Las ratas tratadas con Glucosa y RNasa B1 tuvieron aproximadamente 60 % y 40 % de tumores rojos, respectivamente. Parece que la RNasa B1 administrada por vía oral en la presente formulación también afecta a la angiogénesis, pero de una forma moderada.

Ejemplo 5

El efecto de RNasa B1 en células de cáncer de colon HT-29 humanas in vitro

Material y procedimientos experimentales

Condiciones de crecimiento celular:

Todos los experimentos se realizaron en células de adenocarcinoma de colon humano (HT-29). Las células se cultivaron en matraces de 50 ml que contenían medio DMEM (Biological Industries, Bet Haemek), complementado con suero de ternero fetal 10 %, glutamina 1 % y solución de Antibiótico-Antimicótico 1 % (Biolab). Las células se tripsinizaron, y se sembraron 2 ml de medio que contenían 5×10^4 células en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. Algunas placas se complementaron con RNasa B1, a una concentración final de 10^{-6} M. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera modificada que contenía CO₂ 5 %. Después de 48 horas el medio en presencia o ausencia de RNasa B1 se reemplazó en cada pocillo respectivamente, para mantener un aporte constante de ingredientes y RNasa B1. Después de 4 días el medio se retiró y los cultivos celulares se fijaron en formaldehído 4 % en PBS (NaCl 150 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, NaH₂PO₄ 2 mM) pH 7,2 durante 15 minutos en hielo. Las células se tiñeron para diferentes fines, como sigue.

Tinción directa para actina intracelular:

Las células se lavaron en PBS y se permeabilizaron en PBS que contenía Tween-20 0,02 % (PBST) durante 1 hora

a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS, las células se tiñeron con respecto a actina con faloidina marcada con tetrametilrodamina B isotiocianato (TRITC) 10^{-6} M (Sigma) durante 1 hora y se dejó en reposo en PBS durante una noche a 4 °C para retirar cualquier exceso de material de tinción. Las células se extendieron en agua en un portaobjetos de vidrio y se visualizaron usando Microscopio de Barrido Láser Confocal (LSM) 510 (Zeiss).

5 **Immunotinción para actina de membrana:**

Las células se fijaron con formaldehído y se lavaron con PBS como se ha descrito anteriormente, y después se incubaron con anticuerpos de conejo anti-actina (Sigma) diluidos 1:500 en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y lavados tres veces con PBS. Las células se incubaron después con IgG de cabra anticonejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluido 1:100 en PBS durante otra hora en las mismas condiciones, se lavaron de nuevo y se visualizaron como se ha descrito anteriormente.

Immunotinción de RNasa B1 en la superficie celular:

Se indujeron anticuerpos policlonales (Aminolab, Israel) en conejo contra RNasa B1 purificada. Se usó anti-RNasa B1 como anticuerpo principal en inmunotinción de HT-29, de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

Resultados experimentales

15 **Tinción directa para actina intracelular:**

En células de control que crecían sin RNasa B1, se observó una red de actina fina teñida con TRITC, que llenaba el citoplasma celular. Se observó una tinción ligera en la superficie de membrana (Figura 28a). Por el contrario, en células tratadas con RNasa B1 la membrana y la zona periférica del citoplasma en cada célula se tiñó de forma intensiva (Figura 28b), lo que indica el reordenamiento de la red de actina como respuesta a adición externa de RNasa B1.

Immunotinción para actina de membrana:

La inmunotinción con FITC mostró puntos fluorescentes finos de actina en la zona de la membrana en células de control (Figura 29a). Este resultado coincide con la tinción con TRITC mostrada en la Figura 28a. En este experimento, no se usó detergente, puesto que el anticuerpo apenas penetró en el citoplasma de las células. Por lo tanto, parece que en estas células, la actina de membrana interacciona con el ambiente externo. En células tratadas con RNasa B1 se observó una inmunotinción mucho más débil (Figura 29b), lo que implica que la RNasa B1 unida previamente a actina de membrana interfirió con la unión de los anticuerpos anti-actina.

Se incubaron células adicionales, no tratadas con RNasa B1, con el anti-actina de conejo previamente mezclado y actina 1 μ M. Se observó una fluorescencia débil similar, como se describe en la Figura 29b (no mostrada). Para eliminar la posibilidad de fluorescencia FITC espontánea, las células se trataron como se ha descrito, excepto que se omitió anti-actina. No se detectó tinción fluorescente.

Immunotinción de RNasa B1 en superficie celular:

Apareció fluorescencia de FITC muy débil en células de control incubadas con anti-RNasa B1 (Figura 30a). Sin embargo, las células tratadas con RNasa B1 mostraron una respuesta fluorescente intensa (Figura 30b). Este resultado indica una presencia significativa de RNasa B1 sobre la superficie celular, especialmente en los bordes y extensiones de las células. El tratamiento con suero preinmune de conejo (PIS) en lugar de anti-RNasa B1 dio como resultado una fluorescencia muy débil (Figura 30c).

Ejemplo 6

El efecto de IAc-RNasa B1 en el crecimiento de tubos polínicos de lirios

40 **Materiales y procedimientos experimentales**

Yodoacetilación de RNasa B1:

Se realizó yodoacetilación de RNasa B1 de acuerdo con Irie y col (Irie M, y col. 1986 J. Biochem. 99(3): 627-33). Se disolvió RNasa B1 en 2,5 ml de tampón de acetato 0,1 M, que contenía yodoacetato 0,1 M, a una concentración final de 10 nM. Después de incubación durante una noche a 37 °C, la proteína se desaló en una columna Sephadex G-15. Las fracciones que contenían la proteína se recogieron y se dializaron de forma intensiva frente a agua. Después de liofilización, se obtuvieron 10 mg de proteína. La actividad RNasa de RNasa B1 yodoacetilada (IAc) se comparó con la RNasa B1 no modificada.

El efecto de IAc-RNasa B1 en tubos polínicos de lirios:

Se disolvió IAc-RNasa B1 liofilizada a una concentración final de 1 o 5 μ M en medio de crecimiento de tubos polínicos de lirios que contenía sacarosa 7 %, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1,27 mM, H_3BO_3 0,16 mM, KNO_3 1 mM y KH_2PO_4 3 mM en

5 agua (Yokota E. y Shimmen, T. 1994. Protoplasma 177: 153-162). Se germinaron granos de polen de lirios (*Lilium longiflorum*) *in vitro* en tubos que contenían 100 µl de medio de crecimiento, en presencia o ausencia de IAc-RNasa B1 10^{-6} M. Como controles adicionales, se germinó polen de lirios en las mismas concentraciones de RNasa B1 o BSA en medio de crecimiento. Después de 1,5 horas de incubación a 25 °C en oscuridad, se midió la longitud de los tubos polínicos en cada tratamiento con microscopio óptico.

Resultados experimentales

Yodoacetilación de RNasa B1:

El yodoacetato conduce a la inhibición de actividad RNasa, mediante unión con restos de histidina en el sitio activo de RNasa. La actividad RNasa de IAc-RNasa B1 fue 90 % menor, en comparación con RNasa B1 no tratada.

10 El efecto de IAc-RNasa B1 en el crecimiento de tubos polínicos de lirios:

15 Los tubos polínicos de lirios de control alcanzaron una longitud de 0,26 mm (Figura 31). En este experimento se usó BSA como un control, puesto que no tiene ningún efecto citotóxico en tubos polínicos. De hecho, a una concentración de 10^{-6} M, BSA no tuvo ningún efecto significativo en el crecimiento de tubos polínicos. El efecto inhibitorio de BSA 5×10^{-6} M puede explicarse como resultado del hecho de que los tubos polínicos son sensibles a cambios en el potencial osmótico del medio de crecimiento. Tanto RNasa B1 como IAc-RNasa B1 mostraron un efecto inhibitorio claro en el crecimiento de tubos polínicos. En ambas concentraciones, IAc-RNasa B1 fue más eficaz que RNasa B1, sin embargo las diferencias no fueron significativas. Por lo tanto, en tubos polínicos de lirios, IAc-RNasa B1 inhibe el crecimiento de tubos polínicos de forma similar a RNasa B1 no modificada, lo que muestra que la pérdida de actividad RNasa no reduce su efecto inhibitorio.

20

REIVINDICACIONES

1. Una ribonucleasa de la familia T2 para uso en la prevención, la inhibición y/o la inversión de la proliferación, la colonización, la diferenciación y/o el desarrollo de células tumorales en un sujeto en donde dicha ribonucleasa de la familia T2 es RNasa B1 y estando dicha ribonucleasa desprovista de actividad ribonucleolítica.
- 5 2. La ribonucleasa de la reivindicación 1 para el uso de la reivindicación 1, en donde las células tumorales son células asociadas con un cáncer seleccionado del grupo que consiste en papiloma, blastoglioma, sarcoma de Kaposi, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, astrocitoma, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, enfermedad de Burkitt.
- 10 3. La ribonucleasa de la reivindicación 1 o 2 para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde dichas células tumorales son células cancerosas.
4. Una ribonucleasa de la familia T2 para uso en la inhibición de la angiogénesis de un tumor en un sujeto, en donde la RNasa T2 se une a actina en su forma ribonucleolítica activa o no activa.
- 15 5. La ribonucleasa de la familia T2 de la reivindicación 4 para el uso de la reivindicación 4, en donde la proteína de ribonucleasa T2 tiene un peso molecular de entre 24-36 kDa.
6. La ribonucleasa de la reivindicación 4 o 5 para el uso de la reivindicación 4 o 5, en donde dicho tumor es un tumor metastásico.
- 20 7. La ribonucleasa de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en donde dicho tumor está asociado con un trastorno o una enfermedad seleccionados del grupo que consiste en papiloma, blastoglioma, sarcoma de Kaposi, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, astrocitoma, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, enfermedad de Burkitt.
- 25 8. La ribonucleasa de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde dicha ribonucleasa de la familia T2 se selecciona del grupo que consiste en RNasa T2, RNasa Rh, RNasa M, RNasa Trv, RNasa Irp, RNasa Le2, RNasa Phyb, RNasa LE, RNasa MC, RNasa CL1, RNasa Bsp1, RNasa RCL2, RNasa Dm, RNasa Oy y RNasa Tp.
- 30 9. La ribonucleasa de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde dicha ribonucleasa de la familia T2 se selecciona del grupo que consiste en RNasa T2, RNasa Rh, RNasa M, RNasa Trv, RNasa Irp, RNasa Le2, RNasa Phyb, RNasa LE, RNasa MC, RNasa CL1, RNasa Bsp1, RNasa RCL2, RNasa Dm, RNasa Oy y RNasa Tp, RNasa HI0526, RNasa I, RNasa Irp1, RNS2, RNasa 3, RNasa 1, RNasa LX y RNasa 6PL.
- 35 10. La ribonucleasa de una cualquiera de las reivindicaciones 4-9 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-9, en donde dicho tumor es un tumor maligno.
- 40 11. La ribonucleasa de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en donde dicha ribonucleasa es una ribonucleasa T2 de un organismo seleccionado del grupo que consiste en *Aeromonas hydrophila*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Rhizopus niveus*, *Trichoderma viride*, *Lentinula edodes*, *Irpex lacteus*; *Physarum polycephalum*, *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana glauca*, *Malus domestica*, *Pyrus pyrifolia*, *Momordica charantia*, *Gallus gallus*, *Rana catesbeiana*, *Drosophyla melanogaster*, *Crassostera gigus*, *Todarodes pacificus* y *Homo sapiens*.

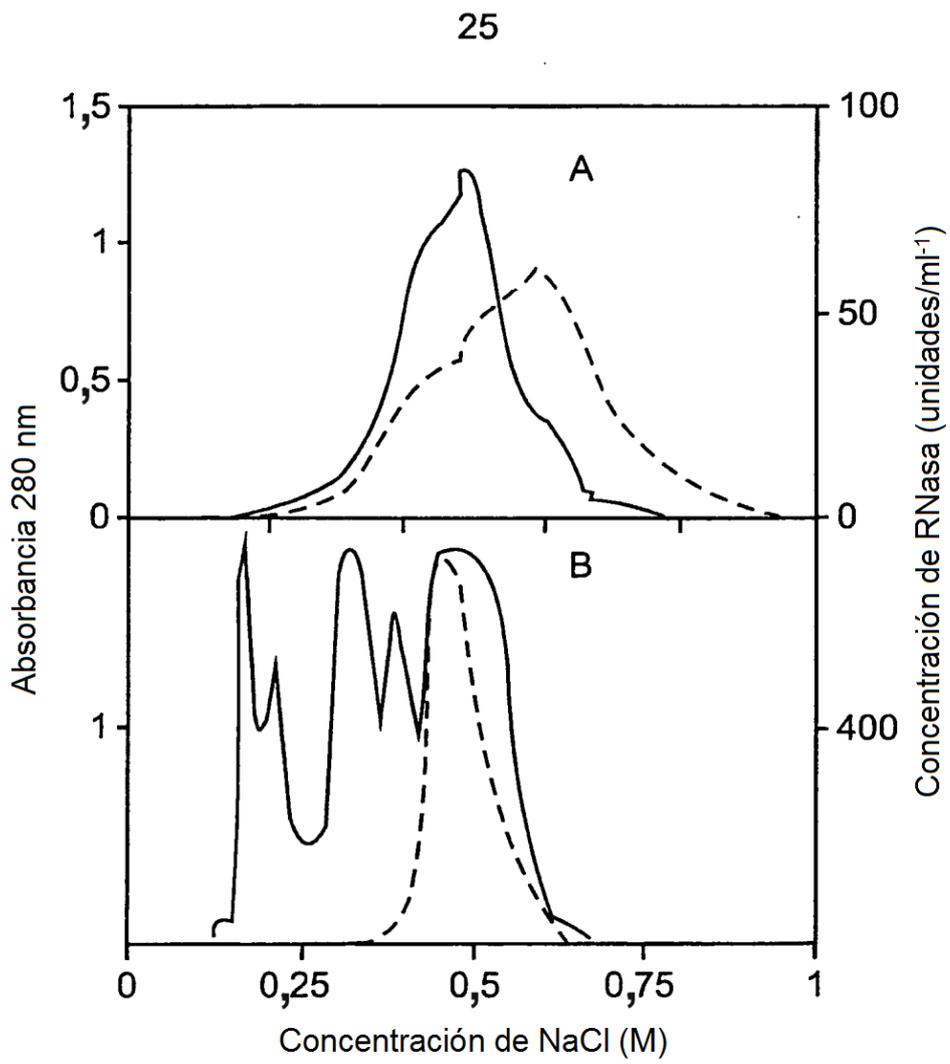


Fig. 1

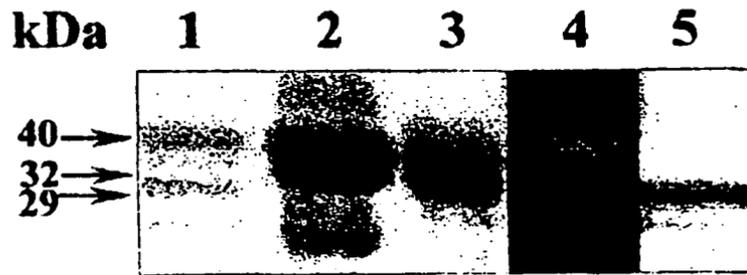


Fig. 2

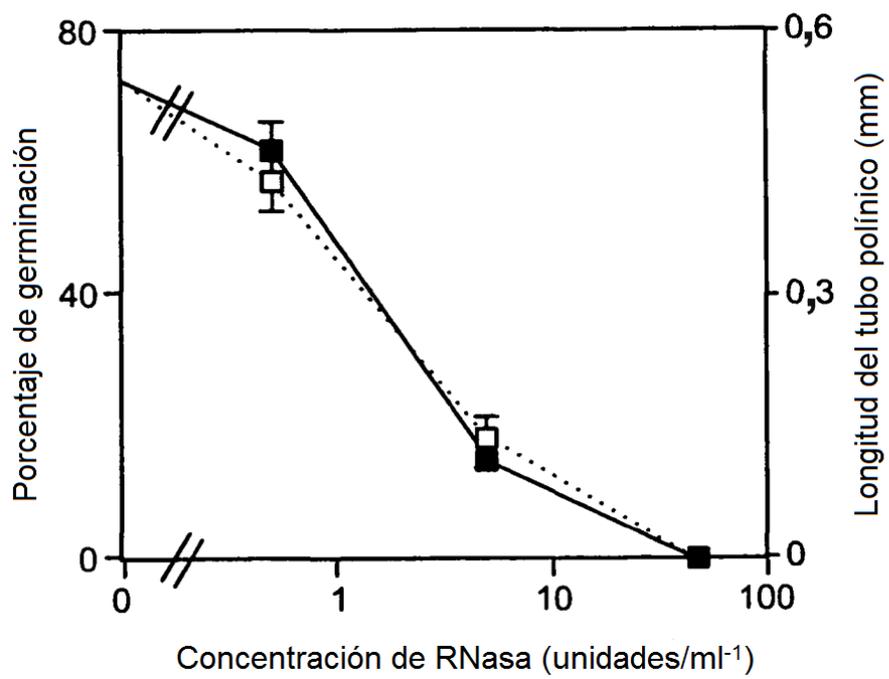


Fig. 3

Fig. 4a



Fig. 4b



Fig. 5a



Fig. 5b



Fig. 6a

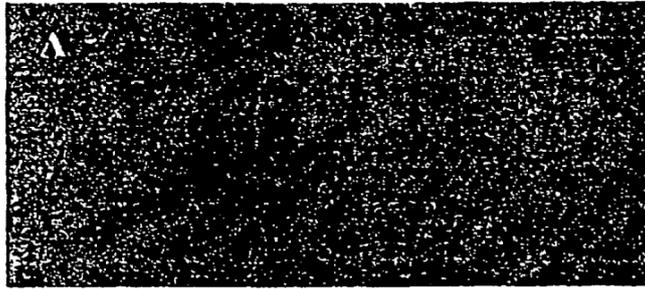


Fig. 6b

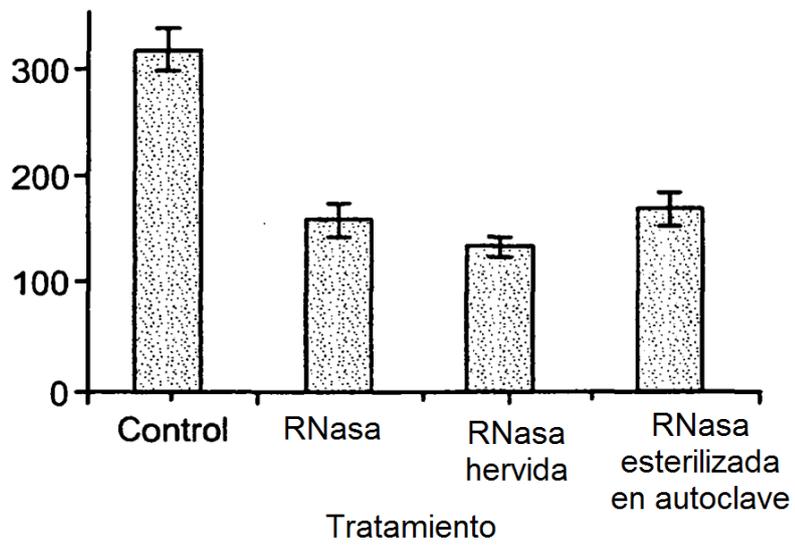
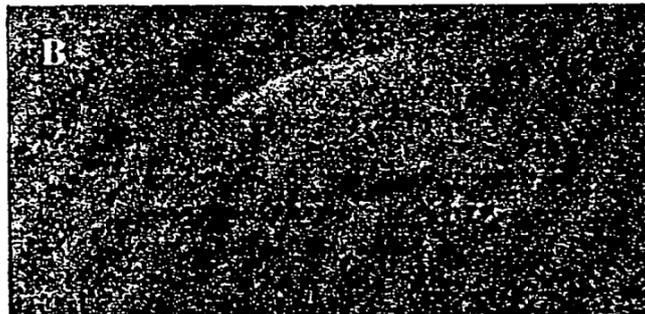


Fig. 7

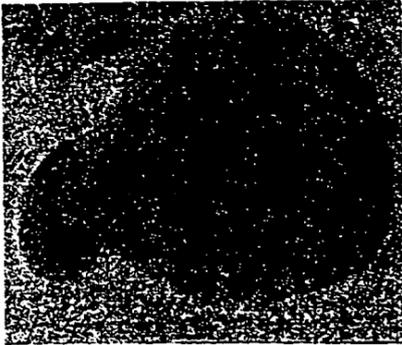


Fig. 8a

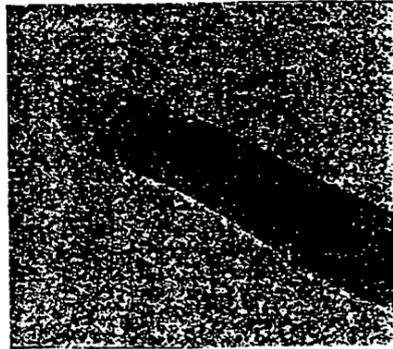


Fig. 8b

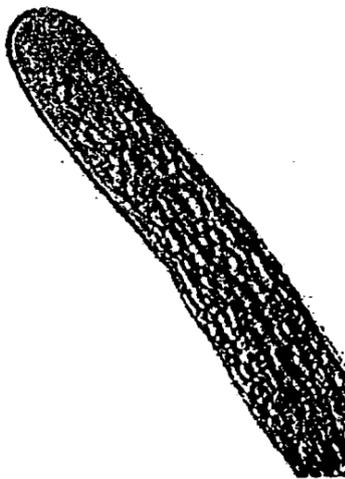


Fig. 9a



Fig. 9b

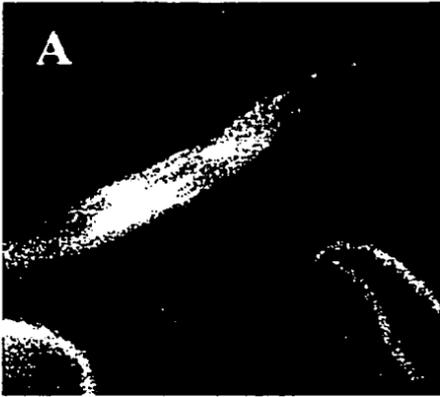


Fig. 10a

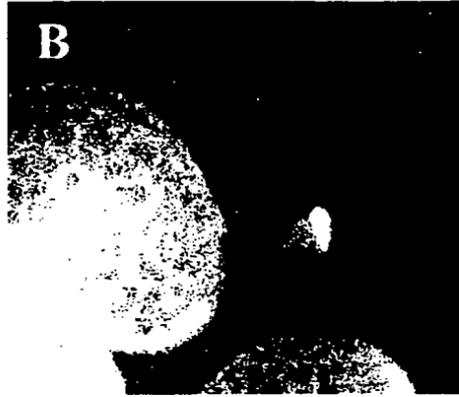


Fig. 10b

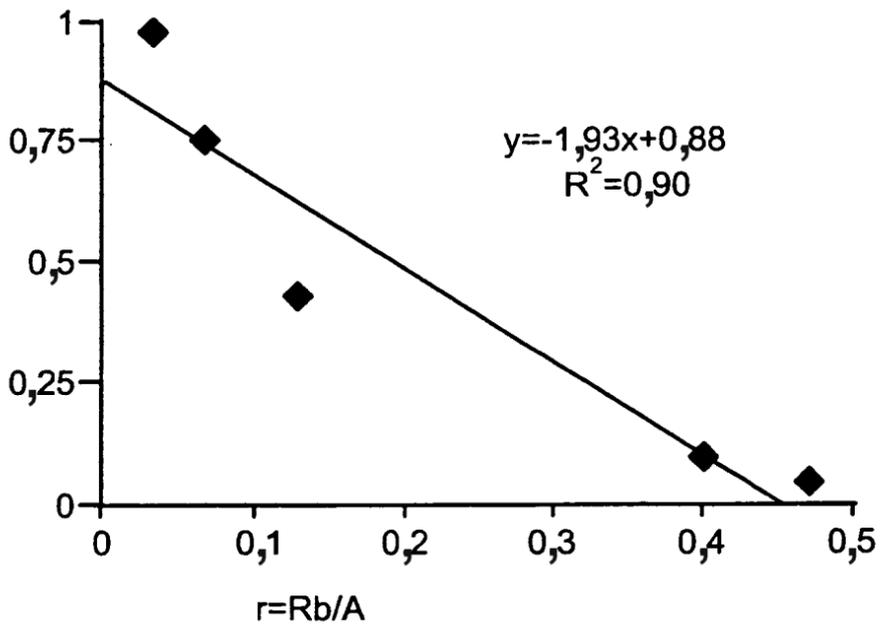


Fig. 11

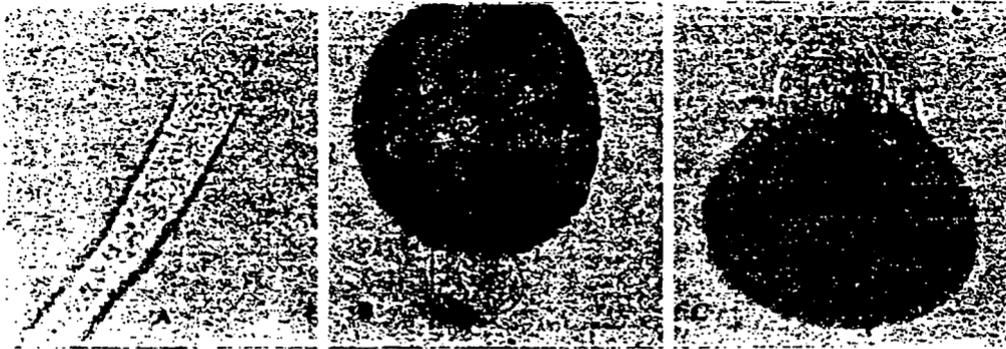


Fig. 12a

Fig. 12b

Fig. 12c

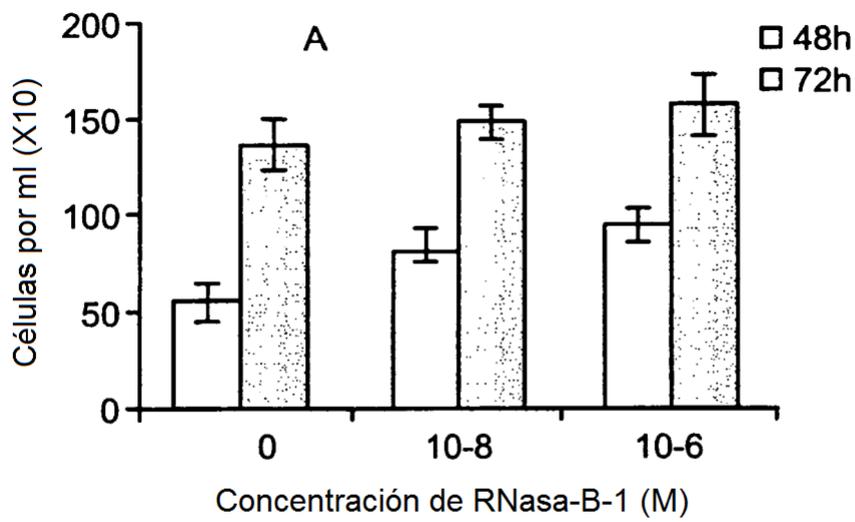


Fig. 13a

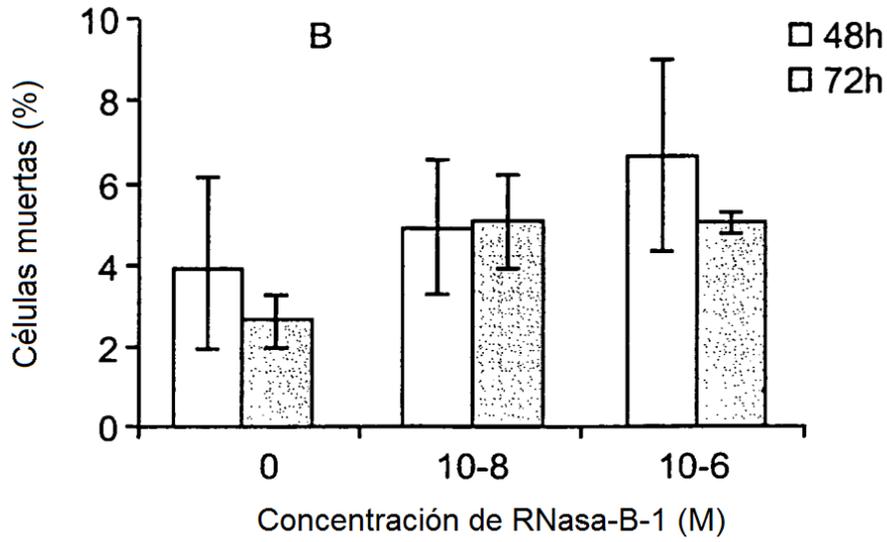


Fig. 13b

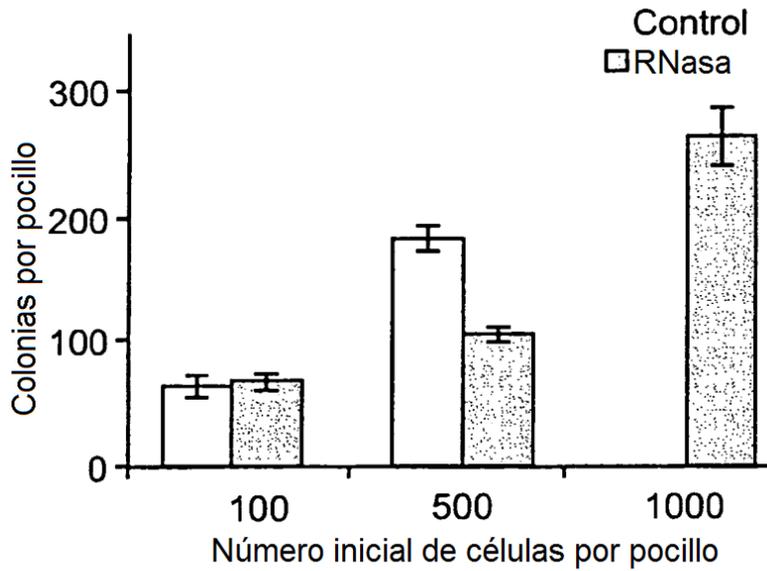


Fig. 14

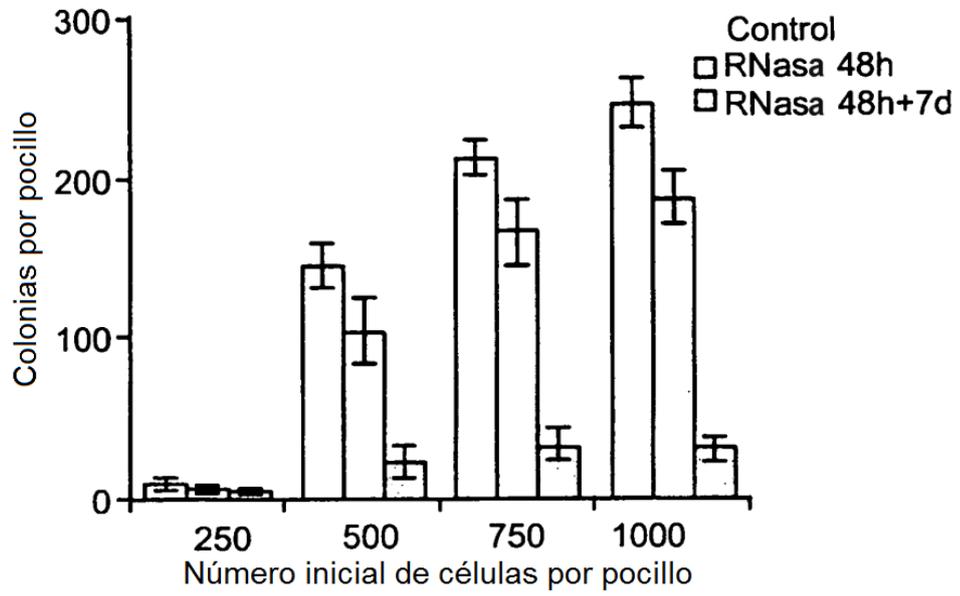


Fig. 15

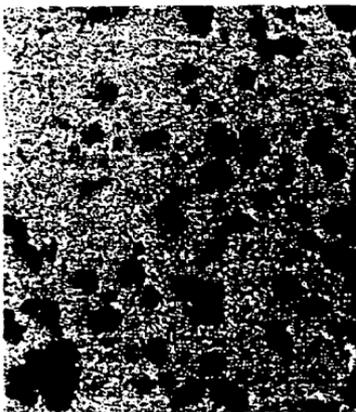


Fig. 16a

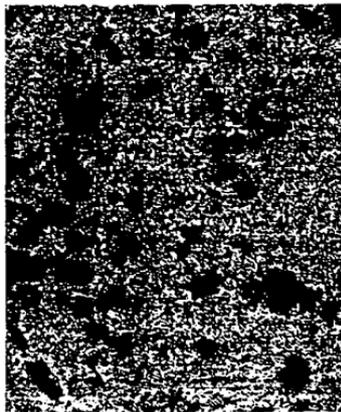


Fig. 16b

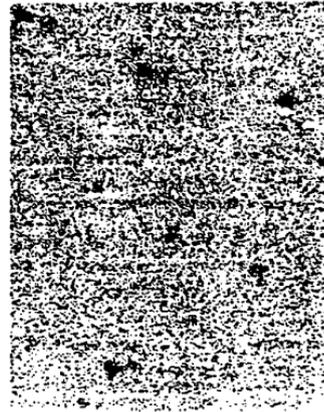


Fig. 16c

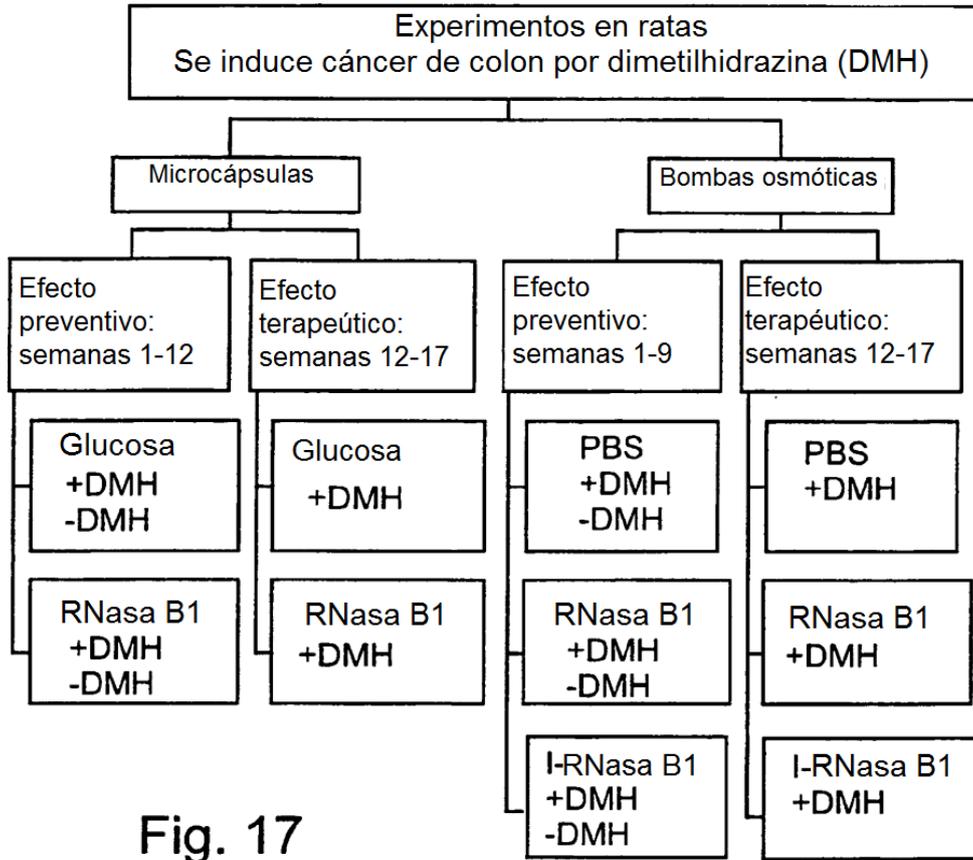


Fig. 17

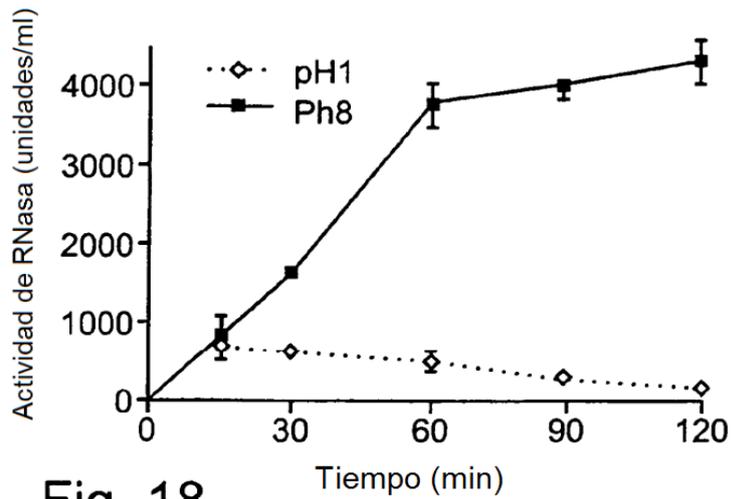


Fig. 18

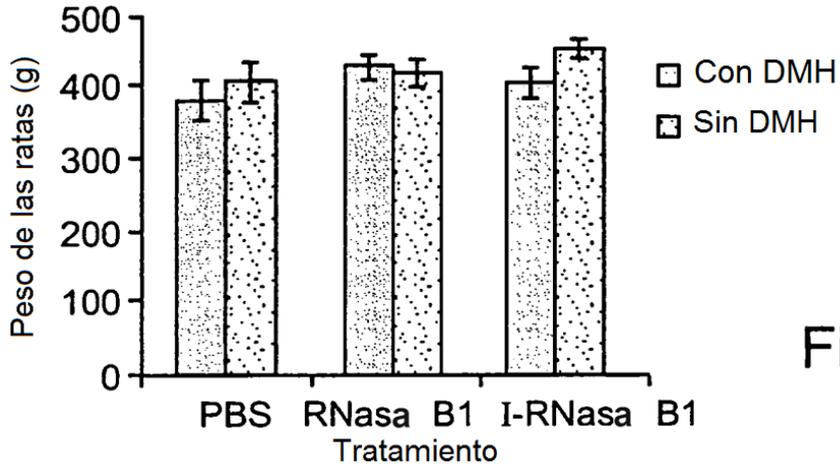


Fig. 19a

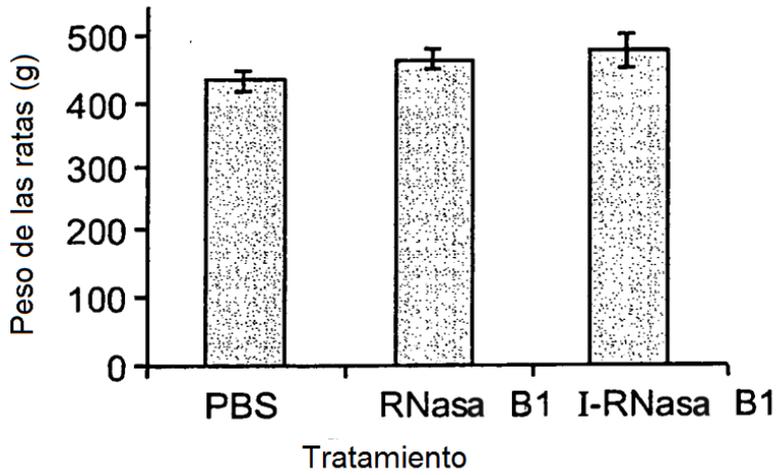


Fig. 19b

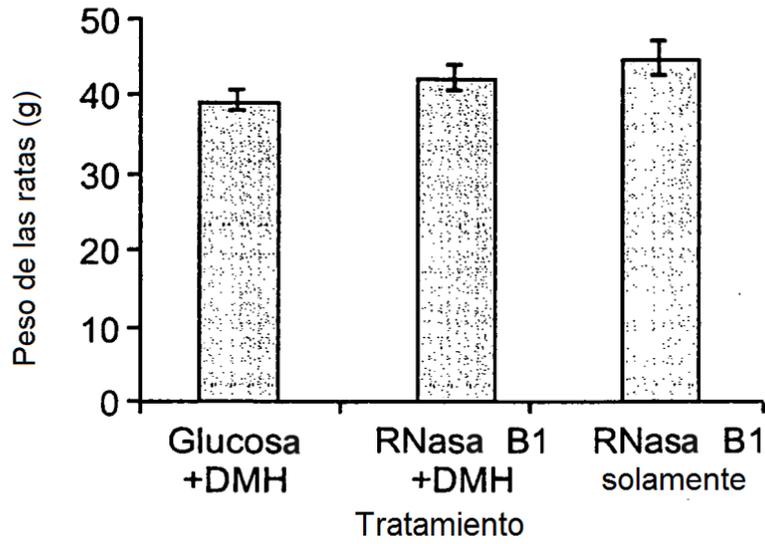


Fig. 19c

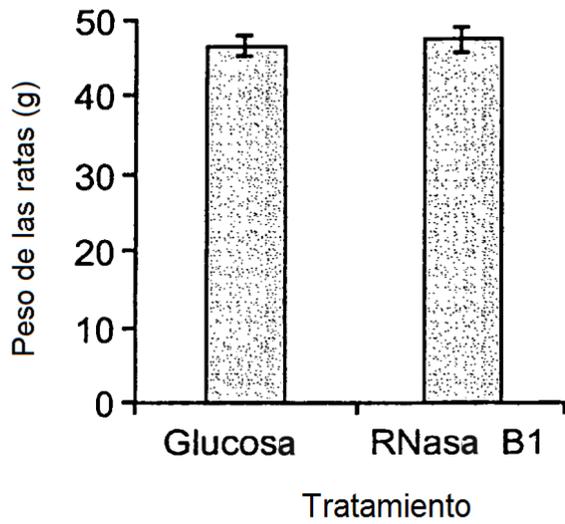


Fig. 19d

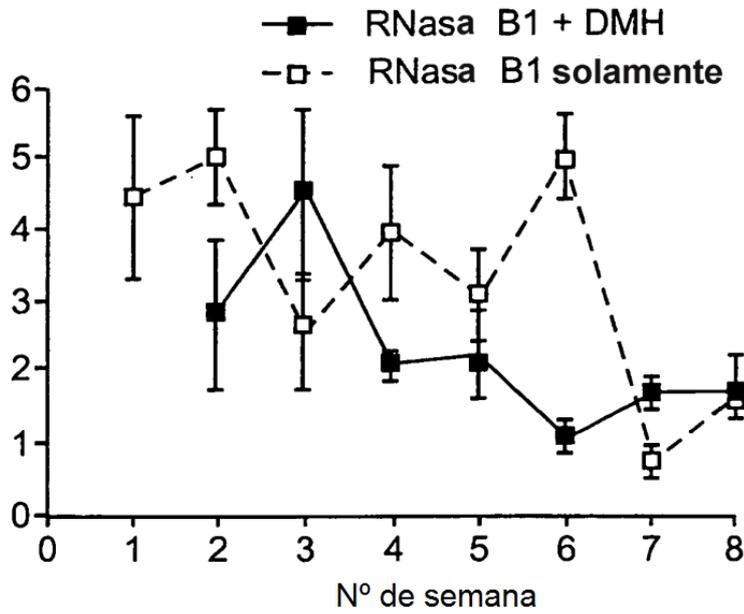


Fig. 20a

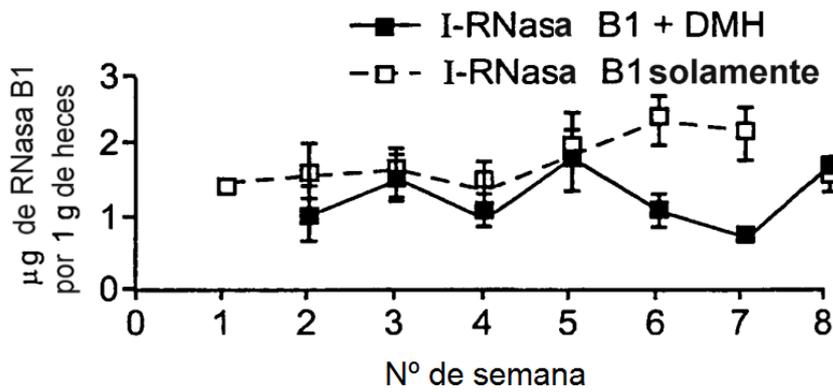


Fig. 20b

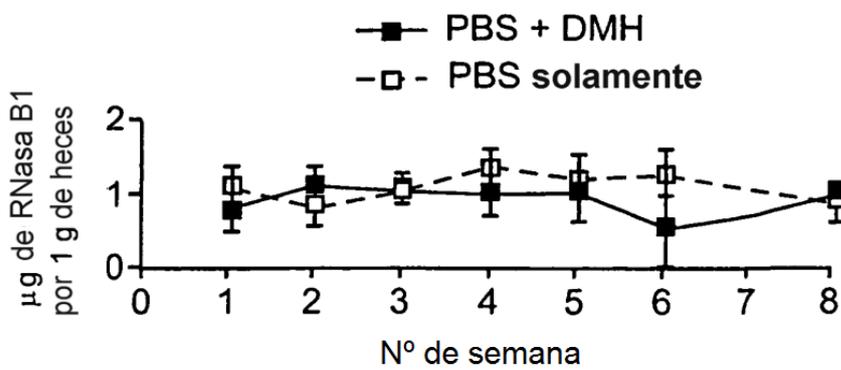


Fig. 20c

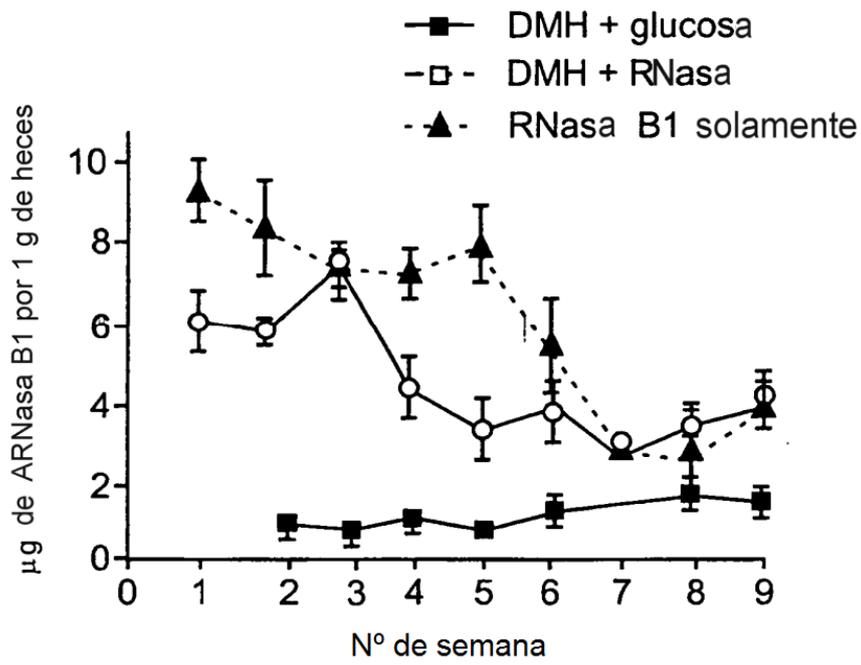


Fig. 21

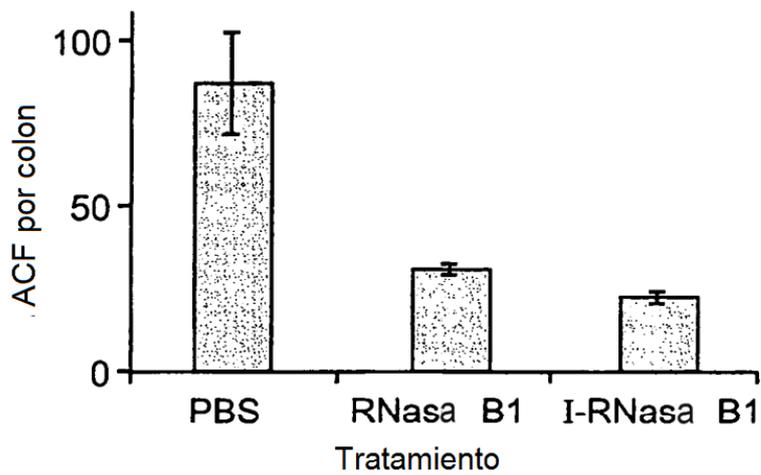


Fig. 22

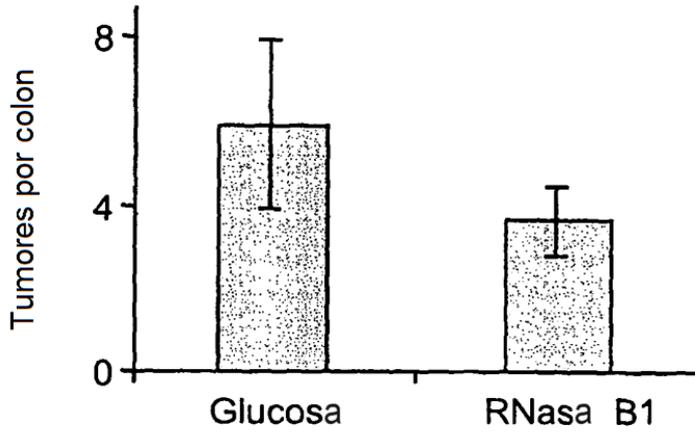


Fig. 23a

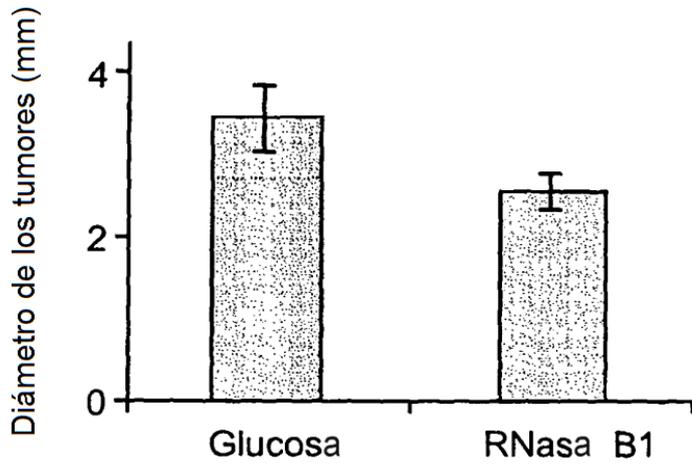


Fig. 23b

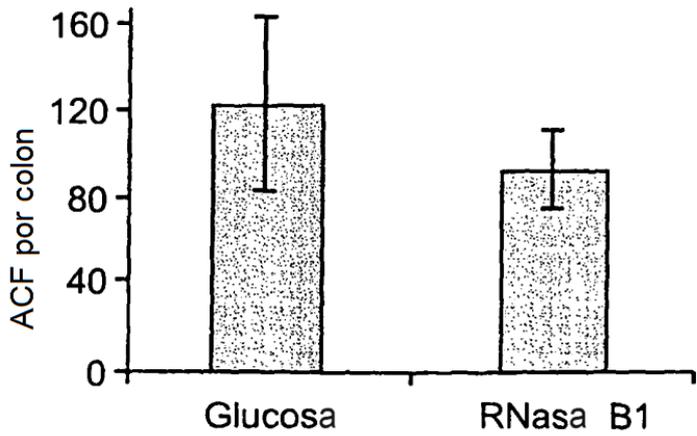


Fig. 23c



Fig. 24a

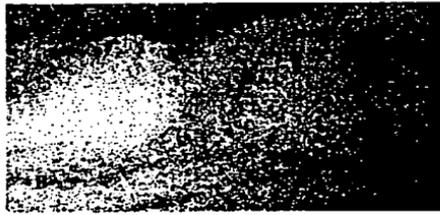


Fig. 24b



Fig. 24c

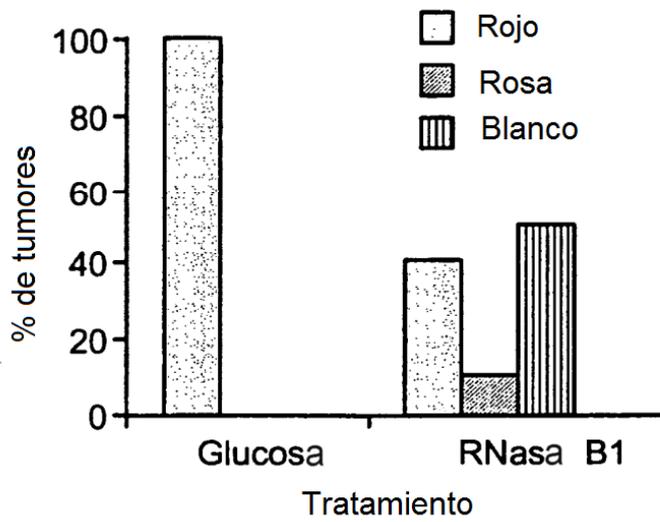


Fig. 24d



Fig. 25a

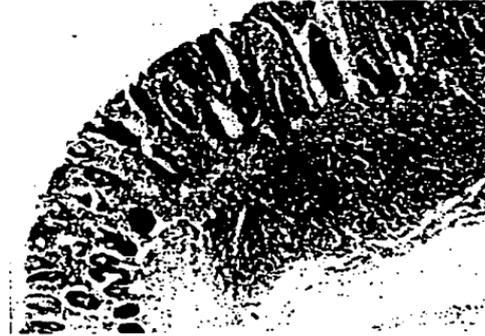


Fig. 25b



Fig. 25c

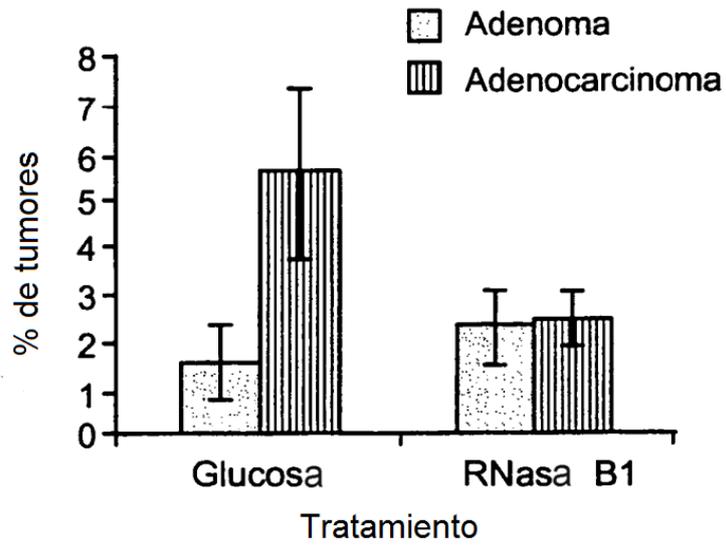


Fig. 25d

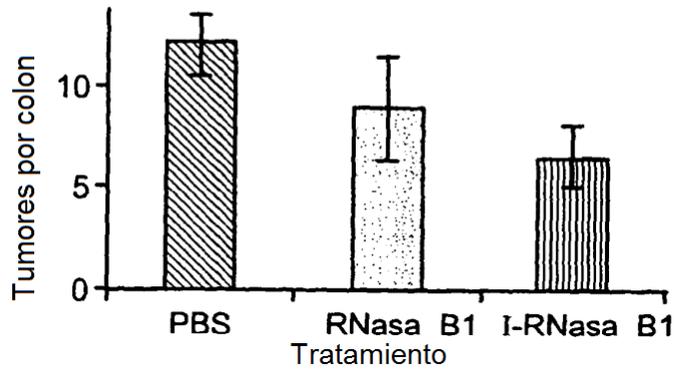


Fig. 26a

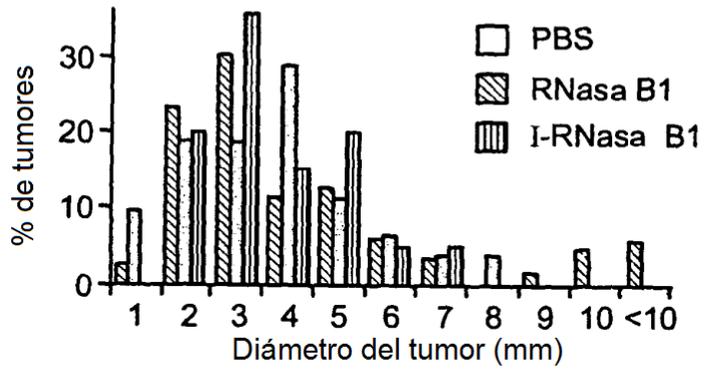


Fig. 26b

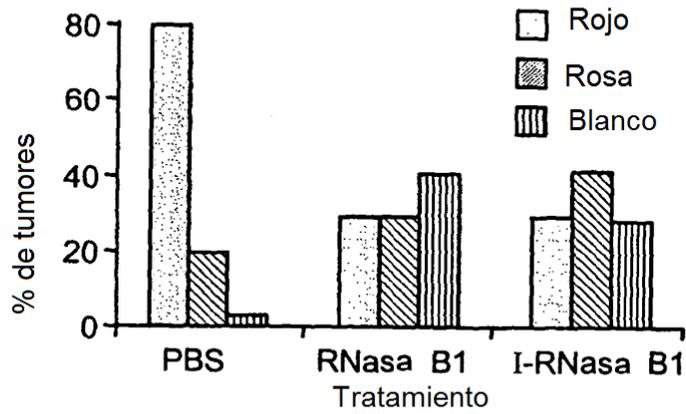


Fig. 26c

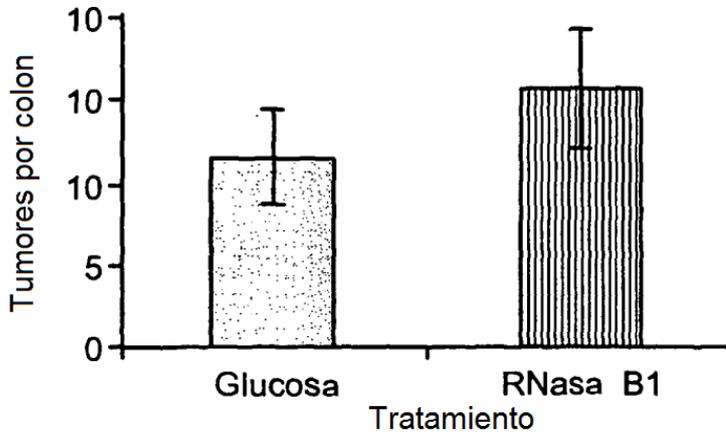


Fig. 27a

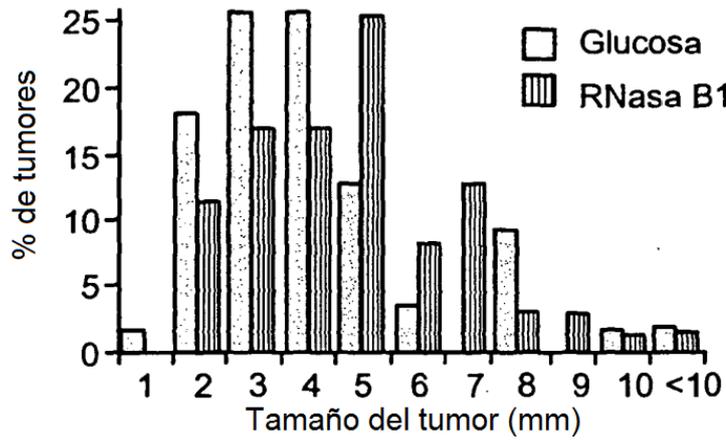


Fig. 27b

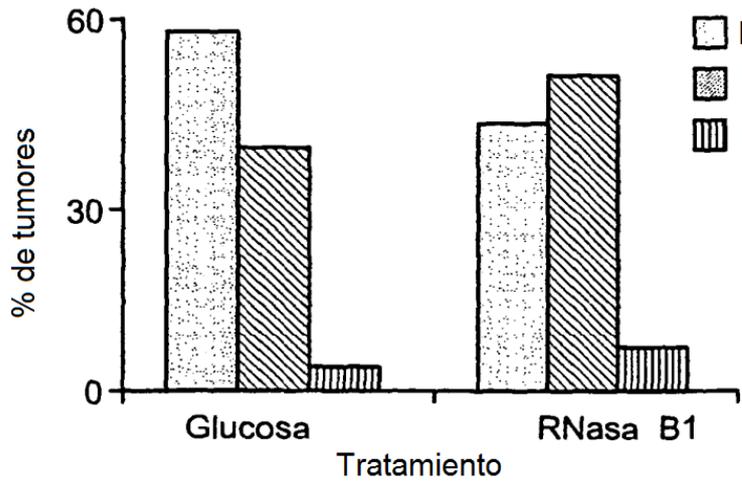


Fig. 27c



Fig. 28a

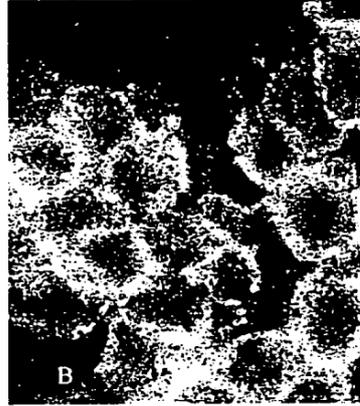


Fig. 28b



Fig. 29a

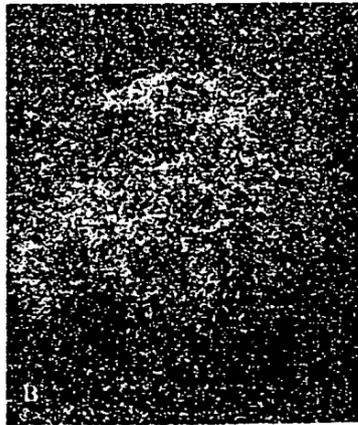


Fig. 29b



Fig. 30a

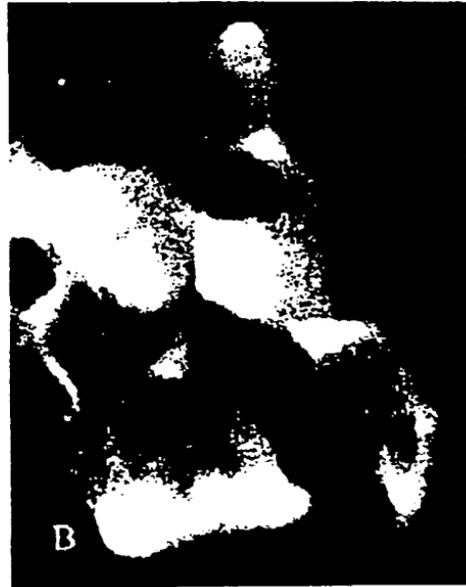


Fig. 30b



Fig. 30c

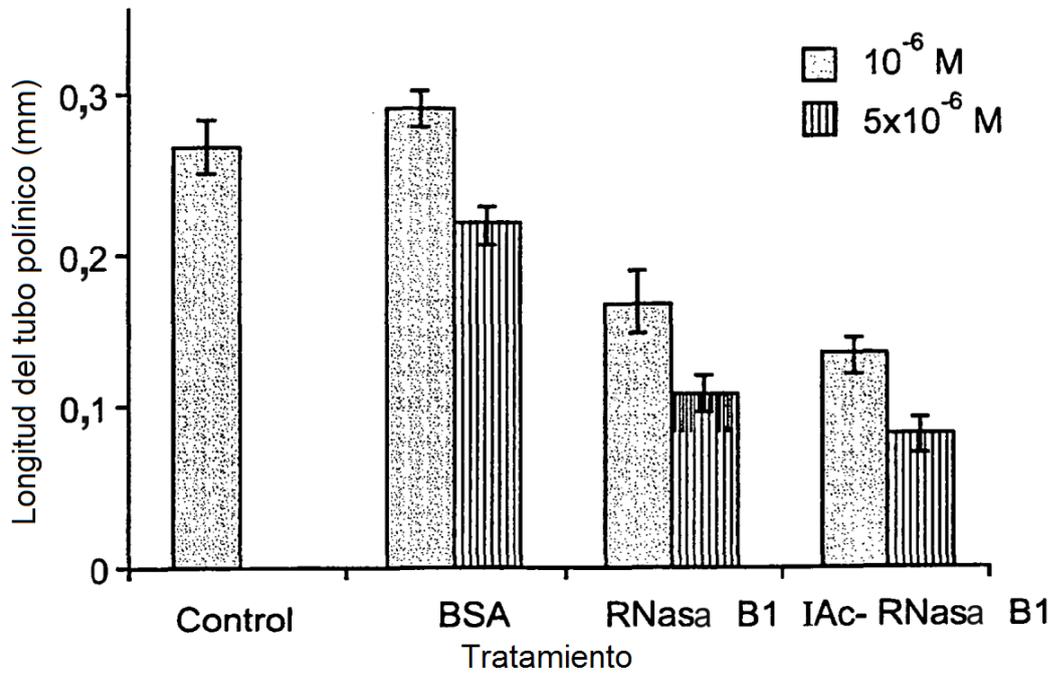


Fig. 31