

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 160**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

A61K 38/55 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2005 E 05782904 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 1799707**

54 Título: **Inhibidor recombinante de tipo Kunitz**

30 Prioridad:

15.09.2004 BR PI0406057

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.07.2013

73 Titular/es:

UNIÃO QUÍMICA FARMACÊUTICA NACIONAL S/A (33.0%)

**Av. Do Café, 277 - 7º andar Vila Guarani
CEP 04311-900 São Paulo, BR;**

**FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO
ESTADO DE SÃO PAULO (33.0%) y
CHUDZINSKI-TAVASSI, ANA MARISA (33.0%)**

72 Inventor/es:

**CHUDZINSKI-TAVASSI, ANA MARISA;
MARIA, DURVANEL AUGUSTO,
BATISTA, ISABEL DE FATIMA CORREIA y
HO, PAULO LEE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 410 160 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

Inhibidor recombinante de tipo Kunitz.

5 La presente solicitud describe el procedimiento de obtención de una proteína recombinante con actividad inhibidora del factor X activado de la coagulación sanguínea; caracterizado como un inhibidor de tipo Kunitz, obtenido a partir de una biblioteca de ADN de las glándulas salivales de la garrapata *Amblyomma cajennense*; el procedimiento de obtención de la secuencia de oligonucleótidos clónica y la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante, el
10 procedimiento de determinación de la actividad inhibidora de dicha proteína recombinante sobre el factor X activado, el procedimiento de determinación de la actividad anticoagulante en el plasma, el procedimiento de determinación de la actividad apoptósica en linajes de células tumorales, el procedimiento de determinación de la actividad antimetastásica en un tumor de melanoma, el procedimiento de determinación de la actividad anticancerosa (melanoma, colon, mama, pulmón y leucemia), *in vitro* e *in vivo*.

15 **Antecedentes de la invención**

Los inhibidores de las proteinasas son moléculas que actúan en los mecanismos normales de control de la actividad enzimática proteolítica y están relacionados con muchos procesos fisiológicos, como la coagulación, la fibrinólisis, la digestión, y también con procesos patológicos como el cáncer, los trastornos hemorrágicos, la inflamación y las alteraciones del equilibrio de la presión arterial (DECLERCK e IMREM, 1994).
20

Uno de los medios más eficientes para controlar la coagulación es la acción de los inhibidores de las proteinasas. Los estudios han demostrado que las glándulas salivales de la mayoría de las especies hematófagas, como las garrapatas, segregan diversas sustancias anticoagulantes con el fin de hacer la sangre más fluida y de este modo optimizar su ingesta de la misma. (RIBEIRO, 1995).
25

Los inhibidores del factor X activado (FXa) tienen un gran interés clínico, ya que a través de la inhibición del FXa (en el complejo protrombinasa) es posible controlar la activación de la protrombina a trombina, evitándose la formación de coágulos.
30

La inhibición de las proteasas se desencadena tan pronto como se inicia el proceso de coagulación. El "inhibidor de la vía del factor tisular" (TFPI) es el inhibidor principal de la vía extrínseca y se ha clasificado como un miembro del grupo de los inhibidores de la familia Kunitz del BPTI (inhibidor de la tripsina pancreática bovina) (Broze, 1998).
35

El TFPI humano es una proteína compuesta por tres dominios de tipo Kunitz (K1, K2 y K3), y el K1, el primer dominio, tiene una región ácida en su parte aminoterminal, donde está situado el sitio de unión al factor VIIa. En el segundo dominio podemos encontrar la parte responsable de la unión del FXa y, finalmente, el tercer dominio presenta una región básica en su parte carboxiterminal cuya función aún no se ha determinado, pero que probablemente contiene un sitio de unión a la heparina (Rao, 1995).
40

El mecanismo de inhibición del TFPI humano comprende dos fases. En la primera fase, el inhibidor se asocia a los factores FXa y FVIIa, aunque la inhibición tiene lugar propiamente en la siguiente fase, en la que se observa la formación de un complejo cuaternario con presencia de factor tisular (TF), FXa, FVIIa y TFPI humano (TFPI: FXa:FVIIa:TF) (Sandset y Bendz, 1997).
45

El inhibidor del factor tisular humano de tipo 2, "inhibidor de la vía del factor tisular - 2" (TFPI-2), es una proteína de 32 kDa formada por tres dominios de tipo Kunitz (Chand y otros, 2004). El TFPI-2 inhibe una serie de serina proteasas implicadas en la coagulación y la fibrinólisis, probablemente debido al residuo de arginina que se encuentra en la posición 24 (R24) del primer dominio de tipo Kunitz. En el segundo y el tercer dominios se pueden encontrar, respectivamente, residuos de glutamina y de serina. En estudios recientes se ha construido un mutante en el que el residuo de arginina se ha modificado por un residuo de glutamina (R24Q TFPI-2), y dicha mutación da lugar al 90% de la pérdida de actividad inhibidora de la tripsina bovina. Este hecho demuestra la importancia de este residuo en el mantenimiento de la actividad inhibidora (Kamei y otros, 1999).
50

55 Aspectos generales del desarrollo del cáncer y sus interacciones con la coagulación

El riesgo de que un individuo desarrolle una neoplasia viene determinado por una combinación de diversos factores genéticos y ambientales. Por consiguiente, en el proceso de carcinogénesis, la sustancia llamada carcinógeno (de naturaleza biológica, química o física) puede actuar como iniciador o incluso promotor del proceso que se desarrolla hasta la formación de metástasis (Ruoslahti E., 1996).
60

En el inicio del proceso neoplásico se producen alteraciones irreversibles en estructuras diana del ADN que contribuyen a la transformación celular. El metabolismo carcinógeno se desarrolla en dos fases llamadas fase I (activación) y fase II (destoxificación). Algunas enzimas de fase I actúan no sólo como catalizadores de reacciones oxidativas, sino que también metabolizan grandes cantidades de sustancias carcinógenas o xenobióticos lipófilos (Bell y otros, 1993).
65

- 5 La persistencia de los daños causados en el ADN depende de los mecanismos de reparación y de la supervivencia celular del tejido dañado; así, si el daño persiste o no se repara, se produce una expansión de un clon celular mutante (Duke y otros, 1996; Wainscoat y Fey, 1990).
- 10 Es un proceso, largo muchas veces que tiene lugar en células iniciadas, que disminuye en el período de latencia y/o que aumenta la susceptibilidad a las alteraciones genéticas. Por lo general, los promotores no son genotóxicos. Son específicos de tejido y tienen múltiples mecanismos de acción que actúan en una forma epigenética que da lugar a alteraciones de la homeostasis tisular (Herms y otros, 1987).
- 15 Entre los mecanismos promotores se incluyen la activación de receptores de la superficie celular, la activación o inhibición de enzimas citosólicas, la activación de factores de transcripción y traducción (por las cinasas), la estimulación de la proliferación, la inhibición de la apoptosis y la citotoxicidad directa.
- 20 En la etapa de progresión, las células tumorales también muestran capacidad para formar nuevos vasos sanguíneos que las alimenten, provocando un aumento descontrolado, ya que en un primer momento invaden los tejidos circundantes y luego pueden penetrar en el interior de un vaso sanguíneo o linfático y, a través de éstos, extenderse a otros órganos. (Meyer y otros, 1998, Matsuda y otros, 2003).
- 25 Generalmente, las células reaccionan a diversos daños intrínsecos generados a partir de productos intermedios del metabolismo, de reacciones inflamatorias graves o crónicas y de procesos que generan metabolitos reactivos inestables de oxígeno y nitrógeno. Por otro lado, existen factores dañinos extrínsecos, como por ejemplo agentes físicos, químicos y biológicos que se eliminan por el proceso homeostático.
- 30 La última etapa (llamada progresión tumoral) incluye la invasión y la metástasis. En esta fase, las lesiones preexistentes o preneoplásicas se añaden a las alteraciones mutacionales aleatorias, incluidas la aberración de la secuencia específica, la duplicación, la delección y/o la pérdida de heterocigosidad en genes específicos como oncogenes, genes supresores de tumores, metastogénesis y genes de reparación.
- 35 Los oncogenes están inactivos en condiciones fisiológicas y se pueden activar cambiando un aminoácido o mediante la amplificación de un gen en un cromosoma que origina diversas copias de dicho gen, con el consiguiente aumento de su actividad y, finalmente, mediante la recombinación entre genes de cromosomas distintos. La diferencia de estos genes es que habitualmente están activos y atentos para evitar el crecimiento descontrolado de las células (Budillon, 1995).
- 40 Aunque la inestabilidad genómica es la característica principal de la progresión tumoral, lo que distingue los niveles de malignidad y los convierte en cánceres mortales es la ausencia de control de la duplicación celular. Las células tumorales, así como las de un tejido normal, se duplican a través del ciclo celular (Fearon ER, 1997).
- 45 Sin embargo, en la comprensión del ciclo celular todavía no se ha determinado por completo el mecanismo de regulación de la multiplicación celular de las células tumorales, y las características de crecimiento de los cánceres *in vivo* todavía no se han dilucidado.
- 50 La naturaleza invasiva de la progresión tumoral se asocia con el aumento de la movilidad de las células tumorales, con la capacidad proteolítica y con la pérdida de la inhibición del contacto célula-célula y célula-matriz. Luego, las células metastásicas se difunden a través de los sistemas circulatorio y linfático por extensión local o incluso por un proceso de implantación. Por consiguiente, las ubicaciones de las metástasis varían en función del tipo de cáncer primario y de los órganos, ya que algunos de ellos, como los músculos, la piel, el timo y el bazo, rara vez presentan metástasis (Goel y otros, 2004).
- 55 Algunos cánceres considerados intratables o sin respuesta terapéutica repiten predominantemente el lugar del cáncer primario y ganglios linfáticos en su región. Estos tumores también pueden producir metástasis durante el tratamiento.
- 60 La incidencia de tumores malignos representa un número significativo y es la segunda causa de muerte en el mundo. En general, el tratamiento del cáncer se basa en la eliminación quirúrgica de los tumores sólidos situados *in situ*, la radioterapia de los tumores en pacientes sin el estado clínico adecuado o sin posibilidades técnicas para su completa eliminación y la quimioterapia en caso de tumores no sólidos o de diseminación de tumores sólidos.
- 65 La quimioterapia, la radioterapia y la cirugía se han convertido en métodos terapéuticos de administración intensiva asociados con otros tratamientos, y la introducción del concepto de tratamientos adyuvantes ha supuesto una innovación en el proceso de control y curación de muchos pacientes enfermos, mejorando los resultados (Tsao y otros, 2004).
- 70 Hoy en día, los protocolos de radioterapia más precisos comprenden la administración de dosis más elevadas en la masa tumoral y menos intensas en los tejidos sanos adyacentes; y tratamientos quimioterápicos con fármacos

5 eficaces contra la neoplasia y menos efectos secundarios, lo que permite una realización más amplia del tratamiento oncológico y, en consecuencia, unos resultados más alentadores en muchos casos. Sin embargo, la mayor parte de tumores sólidos presenta respuestas modestas o ineficientes a la quimioterapia, lo que limita las indicaciones y la eficiencia en el tratamiento adyuvante de tumores locales y en el tratamiento de las metástasis (Sekire y otros, 2004).

10 La elevada incidencia de metástasis que se produce en el 50% de los pacientes con cáncer de pulmón avanzado pone de manifiesto hasta qué punto es necesario desarrollar estrategias terapéuticas nuevas y más eficaces con el objetivo de ofrecer a dichos pacientes oportunidades reales para controlar la proliferación y diseminación de las células neoplásicas.

15 En el siglo XX se produjo un avance extraordinario hacia dicho objetivo cuando se inventaron nuevos fármacos que contenían amplias propiedades antineoplásicas, tales como la mostaza nitrogenada identificada en los años cuarenta y una variedad de otras sustancias con una eficacia parcial o completa contra algunos tipos histológicos de tumores. Aunque tiene lugar una rápida expansión de la selección de fármacos contra el cáncer, que permite el tratamiento de diversos tumores sólidos, como los cánceres de pulmón, colon, mama y próstata, todavía no se ha aplicado un tratamiento sistémico que haya demostrado ser adecuado y eficiente en esa dirección. En los carcinomas de pulmón amicrocíticos y en melanomas de la piel, prevalentes en los países desarrollados aunque frecuentes en todo el mundo, la respuesta modesta al aplicar quimioterapia es de entre el 15% y el 20% en todos los protocolos disponibles y de entre el 40% y el 50% en otras asociaciones terapéuticas (Sekire y otros, 2004).

20 Por consiguiente, resulta vital la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas para mejorar la eficacia terapéutica en las enfermedades neoplásicas avanzadas. La mayor parte de las quimioterapias son conocidas por su capacidad de controlar la proliferación celular y recientemente se han identificado fármacos con una actividad específica contra algunos mecanismos metabólicos exclusivos de las células tumorales (tratamiento diana). En estos tratamientos, las sustancias actúan contra los tumores mediante alteraciones del ciclo celular, lo que permite una mayor eficacia en sus mecanismos de acción.

30 La morbilidad del cáncer relacionada con los tratamientos quimioterápicos sigue siendo un obstáculo importante, por lo que hoy en día parece que un objetivo es la búsqueda de fármacos antineoplásicos de fácil administración con pocos o insignificantes efectos secundarios y mecanismos de acción selectivos para las células neoplásicas.

35 Una de las vías reguladoras implicadas en el crecimiento y la progresión tumoral es el sistema de coagulación sanguínea, donde esta respuesta está causada principalmente por la expresión de factores procoagulantes como el factor tisular (TF), una de las proteínas que desencadenan el proceso de coagulación que conduce a la producción de trombina y a la formación de coágulos.

40 En una segunda fase, las células tumorales expresan el receptor del activador del plasminógeno de tipo urocinasa (u-PA) y los activadores del plasminógeno favorecen la activación del plasminógeno por conversión en plasmina. Este sistema es responsable de la coordinación y remodelación tisular.

45 En los pacientes con neoplasias como adenocarcinomas pulmonares, carcinomas renales y melanoma maligno, se produce una pérdida de homeostasis que provoca alteraciones del sistema de coagulación derivadas de la producción de trombina y factor X activado (Edward RL, 1993). Por otra parte, la activación de la coagulación sanguínea que se produce en pacientes con neoplasias primarias o sometidos a tratamientos quimioterápicos está influenciada por las características biológicas de las células tumorales, cuyos mecanismos todavía no se han comprendido (Rickels y otros, 1992, Schafer y otros, 2003).

50 La evaluación en laboratorio de los parámetros de coagulación ha puesto de manifiesto niveles elevados significativos en determinados tipos de tumores, haciendo posible su determinación en la circulación, como por ejemplo la presencia de fragmentos de protrombina, de dímeros D, del factor XIIa y su correlación de pronóstico (Gordon SG, 1992)

55 El tratamiento de pacientes con tumores primarios, metástasis o que presentan lesiones durante el tratamiento quimioterápico con anticoagulantes con anticoagulantes, como por ejemplo heparinas de bajo peso molecular o inhibidores de la vitamina K (Hoffmal y otros, 2001) ha mostrado eficacia en la prolongación de la vida de los pacientes (Moussa y otros, 2003; Sutherland y otros, 2003). La patogénesis de trombosis venosas en las neoplasias malignas es multifactorial y su mecanismo comprende la liberación de componentes procoagulantes por parte del tumor, factores genéticos e incluso el propio tratamiento (Sorensen y otros, 2003; Gouin-Thibaut e Samama MM, 2000).

60 Los estudios clínicos han demostrado que este fenómeno tromboembólico se puede prevenir mediante el uso de heparinas de bajo peso molecular en cánceres de mama eliminados quirúrgicamente (D. Bergqvist, 2002; Lee y Levine, 2003). Se identificaron las pruebas histológicas y funcionales de la interacción de diversos sistemas biológicos, como el sistema inmunitario, y la coagulación en determinadas neoplasias. Se pusieron de manifiesto importantes alteraciones, como la presencia de factores de activación de la coagulación asociados al infiltrado

inflamatorio, a las células endoteliales y a la neoangiogénesis (Loreto y otros, 2000; Zacharcki D, 2003; Ornstein y otros, 2000; Gale y Gordon 2001; Cotrino J, 1996).

5 Las citocinas derivadas de células tumorales, como el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleucina 1 y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), son quimiotácticas e inducen la formación de vasos, ya que son capaces de inducir la expresión de factores procoagulantes y trombógenos, modificando el estado procoagulante en el microambiente tumoral (Sorensen y otros, 2003, Fernandez y otros, 2004).

10 La presente invención verifica y demuestra que una proteína presente en la saliva de la garrapata *Amblyomma cajennense* tiene una actividad apoptósica en las células tumorales (líneas SK-MEL-28, MEL-85, MEWO, melanoma murino B16F10, leucemia: HL60 promielocítica, K562 de eritroleucemia, células T de Jurkat de leucemia linfoblástica, células T U937 de leucemia, línea YAC-1 de linfoma T murino; H292 de cáncer de pulmón, MCF-7 y MCF-10 de cáncer de mama y SW613-12A1, SW613-B3 de cáncer de colon), y actividad antitumoral *in vivo* (melanoma), así como actividad antimetastásica y antiangiogénica.

15 La presente invención también pone de manifiesto que la proteína recombinante es capaz de estimular la actividad fagocítica de los macrófagos (tasas de diseminación y fagocitaria mediadas por el complemento o anticuerpo) y no tiene actividad citotóxica en las células normales, como células endoteliales humanas derivadas de cordón umbilical, fibroblastos, plaquetas, células polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos humanos, así como en los órganos internos, como riñones, hígado, corazón, bazo y pulmones, en los que no se observó ninguna alteración histopatológica tras un tratamiento prolongado con la proteína.

20 Según la presente invención, se obtiene una proteína recombinante, un nuevo inhibidor del factor X activado, un nuevo agente antitumoral, antimetastásico y antiangiogénico, obtenido a partir de un gen de una biblioteca de ADNc de las glándulas salivales de la garrapata *Amblyomma cajennense*.

25 Lo que se ha obtenido mediante la presente invención se compone de una secuencia de aminoácidos determinada a partir del ADNc de la glándula de la *Amblyomma cajennense* y se puede definir como un polipéptido o proteína cuya secuencia está determinada por el ADNc que codifica las bases 1 a 505.

30 Específicamente, se compone de una proteína recombinante llamada Amblyomin-X y tiene una proteína de dos dominios que presenta homología con los dominios de tipo Kunitz y MAP cinasa.

35 En particular, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de nucleótidos SEC ID nº:1.

También se refiere a un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº:3.

40 Además, también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº:3 o un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº:2.

45 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº:3 o un polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº:2, para su utilización en el tratamiento del cáncer en un individuo.

50 Otro objeto de la presente invención se refiere al polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº:3 o el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº:2 para su utilización en el tratamiento del cáncer en un individuo.

55 Otro objeto de la presente invención se refiere a un método de obtención de un inhibidor de tipo Kunitz del factor Xa (FXa), comprendiendo dicho método el cultivo de una célula hospedadora que comprende un vector que comprende el ácido nucleico de SEC ID nº:1 en condiciones que dan como resultado la expresión del inhibidor codificado por el ácido nucleico.

La presente solicitud da a conocer una acción contra el cáncer, así como permite el desarrollo de vacunas a partir del ADNc.

60 En líneas generales, la presente invención se basa inicialmente en una biblioteca de ADNc constituida a partir de glándulas salivales de la garrapata *Amblyomma cajennense* y la posterior secuenciación de genes aleatorios.

65 Entre las secuencias obtenidas, una se identificó como poseedora de homología con los inhibidores de las serina proteasas (serpinas). La secuencia completa del gen elegido se analizó en un banco de datos y mostró un 17% de homología con el TFPI humano de tipo 1 (inhibidor de la vía del factor tisular) y un 21% de homología con el Ixolaris (inhibidor aislado de la garrapata *Ixodes scapularis*). La proteína se expresó en bacterias *E. coli* en forma de corpúsculo de inclusión y se obtuvo tras la solubilización con urea y β -mercaptoetanol, y a continuación se purificó

en una columna de afinidad de Ni-Sepharose.

La proteína recombinante tiene 13,5 kDa y es capaz de inhibir el factor X activado en sistemas purificados sólo cuando se encuentra en presencia de los fosfolípidos fosfatidilcolina y fosfatidilserina. Por otro lado, la proteína recombinante es capaz de prolongar el tiempo de coagulación del plasma observado en ensayos globales de coagulación como TTPA y TP. La proteína recombinante no mostró ningún efecto sobre las células endoteliales normales (células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano o HUVEC) o sobre los linajes celulares normales de fibroblastos humanos. Sin embargo, produce la muerte celular por apoptosis en diversos linajes de células tumorales; entre ellas, el melanoma murino (B16F10).

Se trataron ratones C57Bl/6J con melanoma B16F10 con la proteína recombinante por vía intraperitoneal y subcutánea utilizando diferentes dosis y con diferentes espaciamientos temporales. Se observó que los animales tratados mostraban una reducción significativa de la masa tumoral (tumor dorsal). Por otro lado, los índices de metástasis se redujeron drásticamente cuando se llevó a cabo el tratamiento durante 14 días tras la implantación tumoral. Cuando el tratamiento se llevó a cabo tras el tercer día a partir de la implantación tumoral, se observaron la remisión completa del tumor y ausencia de metástasis. La proteína parece tener actividad antiangiogénica, ya que inhibió la formación de vasos alrededor del tumor implantado en comparación con el control (sin tratamiento).

La proteína también demostró activar la actividad fagocítica de los macrófagos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Se obtuvieron hemogramas completos de los animales de control y tratados, y los resultados preliminares sugieren que esta proteína inhibe el estado procoagulante presente en los animales con tumores. Por otro lado, el hematocrito y los niveles de hemoglobina están cercanos o son idénticos a los de los animales sanos (sin tumor), lo que demuestra que la proteína no sólo protege al animal contra la anemia, sino que aparentemente no afecta a la médula ósea ni provoca fenómenos hemorrágicos por su capacidad de inhibición del FXa y el tiempo prolongado de tratamiento.

Ventajas en comparación con los tratamientos habituales:

Se indica como agente biológico en lugar de la quimioterapia. Por lo tanto, debe actuar sólo en las células enfermas, no en las sanas, con lo que se evitan los efectos secundarios de la quimioterapia.

Por su potencial inhibidor del FXa, podría utilizarse como un protector de tromboembolismos (anticoagulante) en pacientes sometidos a tratamiento quimioterápico o en pacientes con características protrombóticas.

Como proteína recombinante, se puede obtener en grandes cantidades.

La metodología aplicada en el proceso de obtención y en el análisis de la proteína recombinante se puede resumir en los siguientes procedimientos: Alimentar a las garrapatas y extraerles las glándulas salivales; Obtención del ARN total por el método del fenol e isotiocianato de guanidina; Cuantificación del ARN; Electroforesis en gel de agarosa del ADN; Electroforesis en gel de agarosa del ARN; Purificación del ARNm en columna de afinidad de oligo (dT); Construcción de una biblioteca de ADNc; Síntesis de la primera cadena; Síntesis de la segunda cadena; Cribado por tamaño de los fragmentos de ADNc en gel de agarosa; Unión del ADNc a los adaptadores de *EcoRI*; Digestión con *NotI*; Cribado por tamaño del ADNc en gel de agarosa; Unión del ADNc al vector; Transformación de bacterias competentes; Preparación de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina; Preparación de muestras para la secuenciación; Búsqueda de secuencias; Amplificación del clon seleccionado; Síntesis del oligonucleótido iniciador en la reacción PCR; Reacción en cadena de la polimerasa (PCR); Selección de los plásmidos recombinantes en gel de agarosa; Digestión del ADN plasmídico con enzimas de restricción; Unión al vector de expresión; Inducción de la expresión a pequeña escala; Expresión de proteínas; Estudios estructurales; Análisis de la estructura secundaria del recombinante; Análisis de la estructura primaria y modelo de la estructura terciaria; Ensayos bioquímicos; Inhibición del FXa en presencia de fosfolípidos; Pruebas de coagulación; Cultivo del linaje tumoral humano y murino; Tratamiento de las células tumorales con la proteína recombinante Amblyomin-X; Determinación del contenido de ADN por citometría de flujo; Determinación de las fases del ciclo celular por citometría de flujo; Cultivos de linajes tumorales e implantación tumoral en animales; Observación del crecimiento tumoral; Determinación de la actividad citotóxica; Obtención de macrófagos peritoneales; Cultivo de fibroblastos de piel humana y análisis estadístico.

Para alcanzar la presente invención se utilizaron preferentemente los siguientes materiales:

linaje: *Escherichia coli*:

1) Cepa DH5 α : ϕ 80 *dlacZ* Δ M15, *recAI*, *endAI*, *gyrA9 β* , *thi-1*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *SupE44*, *relAI*, *deoR* Δ (*lac ZYA* - *arg I*) *u169*.

2) Cepa BL21 (DE3): *F'*, *ampT*, *hsdSB*(r_g^- , m_g^-), *dcm*, *gal* (DE3). El bacteriófago DE3 contiene el gen de la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lac UV5*, inductivo con isopropil-tio- β -galactósido (IPTG).

Plásmidos:

1) pGEM-IIzf(+): vector digerido con *EcoRI* y *NotI* utilizado para la construcción de la biblioteca plasmídica. Manual técnico de Promega, 1999.

2) pGEM-T "easy": el plásmido pGEM-T "easy" contiene los promotores T7 y SP6 que flanquean el MCS ("sitio de clonación múltiple") para la subclonación de los productos de PCR. Manual técnico de Promega, 1999.

3) pAE: vector de expresión derivado de pRSETA (Invitrogen) y de pET3-His (Chen, 1994) construido en el Laboratory of Molecular Biotechnology del Butantan Institute (Ramos y otros, 2003).

pAE es un vector de expresión elevada que combina la eficacia del promotor T7 y un gran número de copias plasmídicas de pRSETA, con una fusión aminoterminal de seis histidinas no extraíbles de pET3-His, que permite la purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados ("Immobilized Metal Affinity Chromatography", IMAC). La adición de esta pequeña fusión no interfiere en la actividad de la mayor parte de las proteínas recombinantes estudiadas.

El proceso para la síntesis de oligonucleótidos iniciadores en las reacciones de PCR se inicia como sigue:

Se obtuvieron los oligonucleótidos "sentido" (P1 y P2) sobre la base de la secuencia aminoterminal de la proteína. A estos oligonucleótidos se añadió preferentemente un sitio de restricción para la clonación unidireccional posterior. También se utilizaron los oligonucleótidos "sentido" y "antisentido". Todos ellos se diluyeron en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) para una concentración final de 10 pmol/μl (100 μM).

En lo que se refiere a la preparación de ARNm, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

Se infestaron conejos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) con garrapatas *Amblyomma cajennense* y, pasado el periodo de alimentación, se recogieron las garrapatas hembra y se les extrajo la saliva y las glándulas salivales con materiales quirúrgicos esterilizados. Los complejos salivales de las garrapatas se disecaron, se depositaron en "criotubos", se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron en el congelador a -80°C.

Extracción de ARN total

Las glándulas salivales se sumergieron en reactivo de fenol e isotiocianato de guanidina según la metodología recomendada por el manual del fabricante.

Perfil electroforético del ARN total

Los accesorios del sistema de electroforesis se trataron con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% para eliminar la ARNasa y se lavaron con agua tratada con DEPC tratado en autoclave. Se depositó en la placa gel de agarosa al 1,5% en tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,0. Se aplicaron en el gel dos muestras que contenían 10 μl o 15 μl de ARN total (16,7 ng/μl), 5 μl de tampón de muestra y H₂O tratada con DEPC hasta un volumen final de 25 μl. La migración de las muestras se llevó a cabo en 5 V/cm hasta que el bromofenol alcanzó 2/3 del gel.

Purificación del ARNm en columna de afinidad de oligo (dT) celulosa

El ARNm se purificó en columna de afinidad de oligo dT celulosa que se lavó con NaOH 0,1 N y se equilibró con 1 ml de unión a tampón Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 300 mM, SDS al 0,1%, pH 7,0.

Se añadieron 3 ml de tampón de unión al ARN total, seguido de la incubación a 70°C durante 5 minutos, enfriamiento en hielo durante otros 5 minutos y aplicación a la columna de afinidad. La columna se drenó por gravedad y se lavó con 4 ml más de tampón de unión para eliminar todo el ARN que no era ARNm.

El ARNm se eluyó con 1,5 ml de tampón Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, SDS al 0,1%, pH 7,0, y se recogió en un tubo limpio tratado, se calentó a 70°C durante 5 minutos y se enfrió en hielo durante otros 5 minutos. Tras la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 90 μl de NaCl 5 M al material y se aplicó de nuevo a la columna reequilibrada con tampón de unión. Tras un nuevo lavado con 4 ml de tampón de unión y la elución con 1,5 ml del tampón de elución, el material recogido se precipitó con 90 μl de NaCl 5 M y 3 ml de alcohol etílico absoluto a -80°C "durante la noche". A continuación, el material se centrifugó a 7.000 g durante 20 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante.

El ARNm se lavó con 1 ml de alcohol etílico al 75% y se centrifugó a 7.000 g durante 2 minutos a 4°C. Tras secarlo, el precipitado de ARNm se volvió a suspender en 20 μl de H₂O tratada con DEPC y se almacenó a -80°C.

Cuantificación del ARNm

Para un volumen final de 500 µl, se añadieron 2 µl de ARNm en 498 µl de H₂O Milli-Q tratada en autoclave. Las lecturas de densidad óptica se llevaron a cabo a 260 y 280 nm en cubetas de cuarzo de 500 µl. La concentración de ARNm se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$[\text{ARN}] = A_{260} \times D \times 40 \text{ µg/ml}$$

Donde D = factor de dilución. En lo que se refiere a la construcción de la biblioteca de ADNc, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

La biblioteca de ADNc se construyó sobre la base de 5,0 µg de ARNm aislado utilizando preferentemente el kit Superscript™ Plasmid System for ADNc Synthesis and Plasmid Cloning (Life Technologies) modificado.

Síntesis de la primera cadena

Se diluyeron 5,0 µg de ARNm en 6 µl de H₂O tratada con DEPC, a los que se añadieron 1,5 µl de cebador del adaptador NotI, y se calentó a 70°C durante 10 minutos, se enfrió en baño de hielo y se centrifugó rápidamente. Se añadieron 4 µl de tampón de primera cadena 5x, 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de mezcla de dNTP 10 mM y 0,5 µl de H₂O. La reacción se homogeneizó, se centrifugó rápidamente y se equilibró a 44°C durante 2 minutos. Se añadieron 5 µl de enzima Super Script II RT y la mezcla se incubó a 44°C durante más de 90 minutos. El proceso de enfriamiento a 4°C interrumpió la reacción.

Síntesis de la segunda cadena

Se añadieron 91 µl de H₂O, 30 µl de tampón de segunda cadena, 3 µl de mezcla de dNTP 10 mM, 1 µl de ADN ligasa de *E. coli* 10 U/µl, 4 µl de ADN polimerasa I de *E. coli* 10 U/ml y 1 µl de ARNasa H de *E. coli* (2 U/µl) a la mezcla de reacción de la primera cadena. Tras agitar suavemente la mezcla, se incubó a 16°C durante 2 horas y se añadieron 2 µl de ADN polimerasa I de T4 con 5 minutos más de incubación a la misma temperatura. El enfriamiento en hielo y la adición de 10 µl de EDTA 0,5 M interrumpió la reacción.

Cribado por tamaño de los fragmentos en gel de agarosa

La reacción completa de segunda cadena con adición de 17 µl de Ficoll sin xileno cianol se aplicó al gel de agarosa al 1% y tras 1 cm de migración de la muestra en 80 V del sistema de electroforesis se cortaron dos bandas del gel; una contenía fragmentos de entre 400 y 800 pb (de peso bajo, que se almacenaron en el congelador a -80°C) y la otra fragmentos de más de 1.000 pb (de peso elevado, que se utilizaron para proseguir con la presente invención).

El ADN se purificó a partir del gel usando preferentemente el kit Concert Gel Extraction Systems (Life Technologies) y el ADNc se eluyó con 50 µl de H₂O calentada a 65°C y se concentró a 30 µl en un dispositivo concentrador de vacío.

Unión del ADNc a los adaptadores de *EcoRI*

Se añadieron al tubo de reacción 10 µl de tampón de ADN ligasa de T4 5X, 5 µl de adaptadores *EcoRI* y 5 µl de ADN ligasa de T4 con incubación posterior a 16°C durante 16 horas. A continuación, la reacción se calentó a 65°C durante 10 minutos y se enfrió en hielo. Tras la adición de 2 µl de solución de ATP y 2 µl de polimerasa cinasa de T4, la reacción se incubó durante 30 minutos a 37°C.

El ADNc se extrajo con 55 µl de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó y se centrifugó a 14.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa superior se transfirió a otro tubo y se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto y 1 volumen de acetato de sodio 3 M, y se enfrió a -80°C durante 1 hora. Tras la centrifugación a 14.000 g durante 20 minutos y el lavado con 500 µl de etanol al 70%, el ADNc se secó en flujo durante unos 5 minutos.

Digestión con NotI

Se añadieron 41 µl de H₂O, 5 µl de tampón específico de reacción y 4 µl de NotI al precipitado, homogeneizándolo suavemente y sometiéndolo a incubación durante 2 horas a 37°C.

Segundo cribado por tamaño en gel de agarosa

Se aplicaron 50 µl de la reacción del fragmento de peso molecular elevado al gel de agarosa al 1% y tras la electroforesis las bandas se cortaron del gel y el ADNc de peso elevado se purificó y se eluyó con 50 µl de H₂O, tal como se ha descrito en el primer cribado por tamaño (apartado "Cribado por tamaño de los fragmentos en gel de agarosa").

Unión unidireccional de ADNc al vector pGEM11Zf(+)

5 A la fracción de peso elevado (14 µl) se le añadieron 4 µl de tampón de ADN ligasa de T4, 1 µl de vector de clonación, preferentemente pGEM11Zf(+) (previamente digerido con las enzimas *EcoRI*-NotI) y 1 µl de ADN ligasa de T4, y se incubó a 16°C durante 18 horas.

El proceso de transformación bacteriana de la presente invención sigue los procedimientos descritos a continuación:

10 Transformación de *E. coli* DH5α competente

15 Se añadió ADN de peso elevado (2 µl) a 50 ml de bacterias competentes con calcio (DH5α) almacenadas a -80°C y previamente descongeladas en hielo durante 15 minutos. Las soluciones se incubaron durante 30 minutos en hielo e inmediatamente después se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 2 minutos y se colocaron de nuevo en hielo durante 5 minutos.

20 Se añadieron 350 µl de medio SOC a las bacterias transformadas y se transfirieron a tubos aireados, y se incubaron a 37°C con agitación (220 rpm/min) durante 90 minutos. El ADNc se colocó en placas (2001 de ADNc de peso molecular elevado) con medio 2YT con ampicilina, y las placas se incubaron durante 18 horas a 37°C. Se incubaron 20 colonias que contenían insertos en dos placas a 37°C en 2,5 ml de medio 2YT-ampicilina 100 µg/ml durante 18 horas con agitación de 200 rpm. Los ADNc se purificaron utilizando preferentemente el kit miniprep (Concert Rapid Plasmid, Life Technologies) eluido con 50 µl de TE a 65°C.

25 Para el análisis de la biblioteca de plásmidos, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos: Los plásmidos (4 µl) se digirieron a 37°C durante 2 horas en presencia de 1 µl de tampón específico de reacción, 4 µl de agua; 0,5 µl de enzima *EcoRI* (10 U/µl). Los 0,5 µl de *HindIII* (10 U/µl) y los fragmentos generados se analizaron en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Todos los plásmidos analizados se sometieron a secuenciación.

30 Con el objetivo de obtener la amplificación de la biblioteca, las mezclas que contenían 50 µl de bacterias competentes con calcio DH5α y 5 µl de ADN de peso molecular elevado unido al vector de clonación se incubaron durante 30 min en hielo, durante 2 min a 42°C, y de nuevo en hielo durante otros 5 min. A continuación se añadieron 10 ml de medio 2YT/ampicilina 100 µg/ml. Las soluciones se homogeneizaron suavemente y se pipetearon alícuotas de 2,5 ml a tubos desaireados y se incubaron a 37°C durante 18 h. El ADN plasmídico se extrajo por medio de columnas de miniprep, se eluyó con 50 µl de H₂O a 65°C y se almacenó a -20°C.

35 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

40 Las reacciones PCR ("Polymerase Chain Reaction") preparadas para un volumen final de 50 µl contenían 1 µl de dNTP 10 mM, 5 µl de tampón de ADN polimerasa de Taq 10x, 1,5 µl de MgSO₄ 50 mM, 0,5 µl de ADN polimerasa de Taq 2,5 U. Para amplificar el ADNc que codifica el inhibidor, se utilizaron 4 µl del ADN plasmídico amplificado, 4 µl del oligonucleótido PI 10 pM y 2 µl del oligonucleótido SP6 10 pM. La reacción se incubó en un termociclador en el que se llevó a cabo un programa de desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, 30 ciclos de desnaturalización (94°C durante 45 segundos), hibridación (50°C durante 25 segundos), extensión (72°C, durante 4 min) y una extensión final a 72°C durante 15 min. A continuación, las muestras se aplicaron sobre un gel de agarosa al 1%. Tras 2 h de migración electroforética a 80 V, las bandas correspondientes a los productos de amplificación esperados se cortaron del gel y el ADN se extrajo y se eluyó en 30 µl de H₂O para la unión a un segundo vector de clonación, preferentemente el "pGEM-T Easy Vector Systems" (Promega).

50 Para proceder a la unión del ADN al plásmido se siguió la siguiente metodología:

Las uniones se llevaron a cabo para un volumen final de 10 µl que contenía 6 µl del producto de PCR (1.700 pb), 1 µl de vector pGEMEP T, 2 µl de tampón de ADN ligasa de T4 5x y 1 µl de ADN ligasa de T4 1 U/µl a 16°C durante 18 horas.

55 Se incubaron cepas de *E. coli* DH5α con 5 ml de vector-inserto de reacción de unión y se colocaron en placas. De las colonias formadas, 20 se recogieron para el preinóculo y "miniprep", exactamente de acuerdo con el protocolo descrito para la transformación de células de *E. coli* DH5α competentes.

60 Selección de plásmidos recombinantes en gel de agarosa

65 Antes de procesar las reacciones "miniprep", 300 µl de cada preinóculo se sometieron a un proceso de purificación rápido en fenol:cloroformo. A continuación, se aplicaron 20 µl de cada muestra en gel de agarosa al 1%, en tampón TAB IX. Tras el proceso electroforético, el gel se tiñó con 0,1 µg/ml de solución de bromuro de etidio para seleccionar los plásmidos recombinantes más grandes expuestos a la luz ultravioleta. Los clones positivos del elemento mencionado anteriormente se trasladaron a las "minipreps" y se eluyeron con 60 µl de agua.

Digestión del ADN plasmídico con enzimas de restricción

5 Los ADN de los clones purificados amplificados por PCR utilizando los cebadores P1 y P2 se digirieron a 37°C durante 2 h en una solución que contenía 5 µl de ADN plasmídico, 2 µl de tampón específico de reacción, 0,5 µl de *EcoRI* (10 U/µl), 0,5 de *XhoI* (10 U/µl) y 12 µl de H₂O hasta un volumen final de 20 µl.

Los mismos ADN plasmídicos (5 µl) se incubaron en las mismas condiciones con 1 µl de tampón específico de reacción, 1 µl de *EcoRI* (10 U/µl) y 12 µl de agua.

10 Los productos de digestión se analizaron en gel de agarosa al 1%. Se secuenciaron los clones de la biblioteca y los ADN subclonados en pGEM-T "easy".

15 Para llevar a cabo la secuenciación de los ADN, el método de terminación de cadena por didesoxinucleótido se realizó adaptándolo al secuenciador automático. Se prepararon 400 ng de ADN plasmídico mediante la purificación por minipreps que se utilizaron como molde en la reacción de secuenciación. Se utilizaron los oligonucleótidos descritos T7 y SPβ en las reacciones. Tras el termociclado, los productos de amplificación se separaron en gel de secuenciación de ADN de 36 cm de longitud (4,25% de acrilamida: bisacrilamida en una proporción de 19:1, en TBE IX y urea 7 M). El sistema de detección de este dispositivo está compuesto por una fuente de láser y un detector de fluorescencia situado en la parte inferior del gel de secuenciación. Cada dNTP emite una fluorescencia específica que es capturada por el detector, que envía la información a un ordenador, el cual registra de forma automática la posición del nucleótido en el electroferograma. El proceso se llevó a cabo durante 7 horas. Todos los ADN secuenciados se compararon con las secuencias de GenBank en los sitios www.ncbi.nlm.nih.gov/, basándose en el algoritmo para los programas BLASTx y BLASTn, o www.ebi.ac.uk/ para el programa FASTA.

25 El proceso de expresión de la proteína recombinante preferentemente en la cepa BL21 (DES) de *E. coli* descrita en la presente solicitud sigue los procedimientos descritos a continuación:

Unión al vector pAE

30 Los clones positivos en los que los insertos secuenciados confirmaron la secuencia de Amblyomin-X se incubaron en 7 ml de LB/ampicilina a 37°C durante 18 horas y a continuación se sometieron a minipreps y se eluyeron con 50 µl de agua.

35 Los ADN purificados se digirieron a 37°C durante 5 h en una solución que contenía 20 µl de ADN plasmídico, 5 µl de tampón específico de reacción, 1,0 µl de *EcoRI* (10 U/µl), 1,0 µl de *XhoI* (10 U/µl) y 23 µl de H₂O hasta un volumen final de 50 µl.

40 Tras la electroforesis preparativa en gel de agarosa al 1%, las bandas con aproximadamente 1.000 pb se purificaron a partir del gel y se eluyeron con 30 µl de H₂O y se secaron en vacío a 45°C durante 1 h.

El plásmido se volvió a suspender en 10 µl de H₂O y 3,5 µl de dicha suspensión se incubaron a 16°C durante 18 h con 3,5 µl del vector de expresión pAE (figura 4), 2 µl de tampón 5X para la ADN ligasa y 1 µl de ADN ligasa. También se secuenciaron los clones subclonados en el vector pAE.

45 Inducción de la expresión de Amblyomin-X

50 Con el objetivo de obtener grandes cantidades de la proteína recombinante soluble, la cepa BL21 (DE3) de la bacteria *E. coli* se utilizó preferentemente para la expresión de esta proteína, ya que es una cepa que presenta un crecimiento rápido, es fácil de cultivar y mantener y proporciona una cantidad elevada de proteína recombinante. Esta cepa de *E. coli* es lisogénica y no tiene sistemas de modificación postraduccional.

55 Se inocularon cultivos de *E. coli* transformada preferentemente con el vector de expresión recombinante (PAE-clon 14.16) (figura 4) en 3 ml de medio LB/ampicilina (100 µg/µl) y se incubaron a 37°C hasta obtener una DO_{600 nm} de 0,5. Para el control no inducido, se almacenó 1 ml del preinóculo a 4°C. Se añadió IPTG hasta una concentración de 0,5 mM al resto del volumen y la incubación se mantuvo durante 3 h más. Se añadieron 10 µl de tampón de aplicación de SDS-PAGE con β-mercaptoetanol 0,1 M a cada 40 µl de cultivo. Las muestras se hirvieron durante 12 min y se aplicaron sobre geles de poliacrilamida al 12,5%. A continuación, el gel se tiñó con un 0,25% de "Coomassie Blue Brilliant" en metanol al 50% durante 18 h y se decoloró con ácido acético al 10% en agua durante 3 h a temperatura ambiente.

60 Para obtener la expresión de la proteína (Lopap) descrita en la presente solicitud, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

65 Se inocularon cultivos de *E. coli* transformada preferentemente con el vector de expresión en 100 ml de medio LB/ampicilina (100 µg/µl) y se incubaron a 37°C hasta obtener una DO_{600 nm} de 0,5. Se incubaron alícuotas de 25 ml en 4 botellas diferentes con 500 ml de LB/ampicilina (100 µg/µl) durante 90 min a 37°C. A continuación se añadió

IPTG hasta una concentración final de 1 mM y la incubación se mantuvo durante 4 h más. A continuación, el medio se centrifugó a 12.000 rpm y se congeló a -70°C durante 18 h. Luego, las células de las 4 botellas se volvieron a suspender en 70 ml de tampón de lisis de NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, y se traspasaron a una prensa de émbolo a 2000 GAGE tres veces y se centrifugaron a 5.000 rpm durante 15 min a 4°C.

El sobrenadante que tenía la proteína expresada soluble se centrifugó a 15.000 rpm durante 30 min para clarificación y se aplicó a una columna de afinidad de Ni-Sepharose equilibrada previamente con tampón de lisis. La columna se lavó con tampón de imidazol 80 mM, β-mercaptoetanol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris HCl 50 mM, pH 6,8, y se recogió el volumen de lavado. La proteína se eluyó con Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, imidazol 1 M, NaCl 100 mM, con un caudal de 1 ml/5 min.

Los "pellets" (corpúsculos) del medio sometido a la prensa de émbolo y centrifugados se volvieron a suspender en 20 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, urea 1 M, Triton X-100 1%, pH 8,0, para eliminar los componentes hidrófobos, y se centrifugaron a 5.000 rpm durante 15 min a 4 °C. El precipitado separado se incubó a temperatura ambiente durante la noche con 10 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, urea 8 M, β-mercaptoetanol 10 mM, pH 8,0, para la solubilización de los corpúsculos.

Este material se centrifugó de nuevo a 4.000 rpm durante 20 min a 4°C y el sobrenadante se añadió gota a gota al tampón de "replegamiento" Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM y β-mercaptoetanol 5 mM, pH 8,0, como alternativa para obtener la proteína con la estructura correcta; Otro enfoque para llegar a esta fase fue utilizar el tampón con adición de CaCl₂ 100 mM) con agitación constante a temperatura ambiente durante 18 h. El material se filtró y se aplicó a una columna de Ni-Sepharose previamente equilibrada con tampón de lisis. La columna se lavó con 180 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, pH 6,8, y se eluyó con Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, imidazol 1 M, NaCl 100 mM, con un caudal de 1 ml/5 min.

Se analizó la capacidad inhibidora del factor Xa de la proteína recombinante obtenida y se llevaron a cabo pruebas de coagulación y de control de las células tumorales.

El depósito de la secuencia se incluyó en bancos de datos con restricciones de acceso hasta abril de 2005 Bankit 608.848.

Los ensayos bioquímicos para determinar la inhibición del FXa se llevaron a cabo en presencia de fosfolípidos. Las membranas fosfolipídicas se prepararon tal como se describe en Barenholz y otros, 1977.

La inhibición del FXa en presencia de la membrana fosfolipídica se determinó mediante la medición de la actividad enzimática residual sobre el sustrato de aminometilcumarina con el sitio de hidrólisis del FXa, o un sustrato cromógeno comercial.

Las reacciones de hidrólisis llevadas a cabo a 37°C en tampón Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 - 8,0, se controlaron mediante la fluorescencia a longitudes de onda de 380 nm (excitación) y 460 nm (emisión) con un espectrofluorímetro, o con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm en el caso de sustratos cromógenos.

La proteína recombinante según la presente invención, cuando se utiliza en dosis de 5 a 10 μM, inhibe la actividad amidolítica del factor X activado humano en condiciones purificadas y en presencia de fosfatidilserina/fosfatidilcolina y en el plasma.

En dosis de entre 0,3 y 1,2 μM, la proteína induce la apoptosis (muerte celular programada) en células de linaje tumoral (B16F10, SK-MEL-28) con parada del ciclo celular en G2/M.

A estas concentraciones, la proteína no induce efectos apoptóticos en las células normales (HUVEC, leucocitos polimorfonucleares, fibroblastos humanos, plaquetas y macrófagos).

El tratamiento de ratones C57BL/6J isogénicos implantados con tumor melánico B16F10 (con un volumen tumoral de aproximadamente 0,5 mm³ en el 12º día) con una dosis de 1,0 mg/kg por vía intradérmica durante 14 días puso de manifiesto que la proteína recombinante Amblyomin-X no es capaz de reducir significativamente la masa y el volumen tumorales. También puede reducir el número de metástasis pulmonares, hepáticas y esplénicas.

El tratamiento con la proteína recombinante Amblyomin-X en una dosis de 0,5 mg/kg se administró por vía intraperitoneal durante 42 días y se inició tras el tercer día de la implantación de las células tumorales B16F10 por vía endovenosa en los ratones C57BL/6J. La Amblyomin-X es capaz de provocar la remisión total de la masa y el volumen tumorales y de obstaculizar de forma significativa la formación de metástasis. El análisis anatomopatológico de los tumores y lesiones metastásicas de los pulmones, el hígado y el bazo de los animales con tumores tratados con Amblyomin-X, y la comparación con los de los animales no tratados, puso de manifiesto que la proteína recombinante promueve un reconocimiento selectivo de las células tumorales, inhibiendo la capacidad proliferativa de las rutas de señalización del sistema de la MAP cinasa y la neoangiogénesis que conduce a la muerte celular. El

análisis microscópico del parénquima de los órganos internos, como el hígado, el bazo y los pulmones, no presentó alteraciones citológicas significativas incluso después de 42 dosis terapéuticas.

5 El análisis hematológico de los animales con tumores sometidos al tratamiento puso de manifiesto que la proteína recombinante mejora significativamente la condición hematológica, manteniendo el hematocrito, la hemoglobina y la celularidad dentro de niveles normales en comparación con los animales no tratados con anemia grave.

10 Tal como se describe en la presente solicitud, se obtiene un compuesto que contiene una secuencia del ADNc de la glándula de la *Amblyomma cajennense*. Dicho compuesto se compone de un polipéptido o proteína cuya secuencia se determinó a partir del ADNc que codifica de la base 1 a la base 505.

15 La proteína recombinante obtenida a partir del compuesto se denominó Amblyomin-X. Se trata de una proteína de dos dominios, de tipo Kunitz y MAP cinasa, y es útil en el tratamiento de tumores y para el desarrollo de vacunas a partir del ADNc. También presenta actividad biológica para las proteínas factor Xa, X y VII, y también en el complejo factor VIIa/TF, mostrándose como un candidato potencial para la modulación de la función anticoagulante.

20 La administración del péptido, polipéptido o proteína mejora el estado de los pacientes con enfermedades relacionadas con complicaciones cardiovasculares y tromboembólicas; disminuye las metástasis de los tumores malignos; disminuye el crecimiento y la difusión de los tumores malignos; inhibe la metástasis de los tumores malignos; tiene actividad anticoagulante en condiciones prequirúrgicas y posquirúrgicas, se puede utilizar para la prevención de tromboembolias en condiciones que generan cuerpos apoptóticos (moléculas ricas en fosfolípidos), en enfermedades degenerativas y en tumores malignos se puede utilizar para mejorar la respuesta inmunitaria. Se puede utilizar como coterapia en el tratamiento quimioterápico de los tumores malignos; como coterapia en el tratamiento con radioterapia de los tumores malignos; como coterapia en el tratamiento quimioterápico de los tumores malignos con complicaciones tromboembólicas. También se puede utilizar como coterapia en el tratamiento con radioterapia de los tumores malignos con complicaciones tromboembólicas; puede modular la muerte celular programada (apoptosis); puede modular la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tumor y se puede utilizar como agente para la terapia dirigida a diana.

30 Modelado de la estructura terciaria de la Amblyomin-X

A partir de la secuencia obtenida por el ADNc, se llevó a cabo un estudio para el modelado de la Amblyomin-X utilizando el programa Swiss PDB Viewer 3.7 (b2) y el servidor Swiss-Model. La presente invención tiene su campo de aplicación en los sectores médico y veterinario.

35 Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa. Muestra: ARN total extraído de las glándulas salivales de *A. cajennense* por el método de fenilo e isotiocianato de guanidina.

40 Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa. 1 y 2: ARNm purificado por columna de oligo (dT); 3: Material no retenido en la columna de oligo (dT); 4: ARN total.

45 Figura 3: Insertos de ADNc de la biblioteca de plásmidos. Electroforesis en gel de agarosa al 1-2% que muestra los fragmentos obtenidos por 16 clones aleatorios de la biblioteca de plásmidos tras la incubación durante 2 horas con *EcoRI* y *HindIII*. De 1 a 16: productos de escisión de los clones aleatorios; 17: marcador.

Figura 4: Secuencia completa del clon seleccionado (SEC ID n°:1).

Figura 5: Traducción de la secuencia de nucleótidos del clon seleccionado para la secuencia proteica (SEC ID n°:2).

50 Figura 6: Secuencia de la proteína madura (SEC ID n°:3).

Figura 7: Secuencia 5'-3' del "cebador" construido para la amplificación del clon seleccionado para la expresión (SEC ID n°:4).

55 Figura 8: SDS-PAGE 15%. Purificación del inhibidor recombinante en columna de Ni-Sepharose. 1) marcador de masa molecular; 2) entrada de material para cromatografía; 3 a 8) fracciones eluidas en la purificación.

Figura 9: Comparación de las estructuras primarias de la Amblyomin-X y de Ixodes.

60 Figura 10: Curva de inhibición del factor Xa en presencia de fosfolípidos y concentraciones crecientes del inhibidor recombinante.

Figura 11a: Curva de prolongación de tiempo de tromboplastina parcialmente activada en ausencia y presencia de concentraciones crecientes del inhibidor recombinante.

65 Figura 11b: Curva de inhibición del tiempo de protrombina (TP) en ausencia (control) y con concentraciones

crecientes del inhibidor recombinante.

Figura 12: Tiempo de coagulación con PS: PC o cuerpos apoptóticos en presencia y ausencia de Amblyomin-X.

5 Figura 13: Aspectos citológicos de las alteraciones provocadas por el tratamiento con Amblyomin-X (0,3 μ M) en células B16F10 después de 6 horas.

Figura 14: Aspectos citológicos de las alteraciones provocadas por el tratamiento con Amblyomin-X (0,3 μ M) en células B16F10 después de 12 horas.

10 Figura 15: Aspectos de las alteraciones citológicas provocadas por el tratamiento con Amblyomin-X (0,3 μ M) en células B16F10 después de 24 horas.

15 Figura 16: Análisis de la inhibición de la adhesión celular de células de melanoma B16F10 tratadas con diferentes concentraciones de Amblyomin-X.

Figura 17: Efecto de la Amblyomin-X en la viabilidad de las células de melanoma B16F10.

20 Figura 18: Análisis del crecimiento del melanoma dorsal B16F10 tratado con Amblyomin-X durante 14 días.

Figura 19: Aspecto macroscópico de los tumores dorsales producidos tras la implantación de células de melanoma B16F10 y tratados con 1mg/kg de Amblyomin-X durante 14 días.

25 Figura 20: Curva de crecimiento del peso tumoral tras el tratamiento con Amblyomin-X.

Figura 21: Número de nódulos tumorales presentes en el parénquima pulmonar tras el tratamiento con Amblyomin-X durante 14 días.

30 Figura 22: Distribución de tamaños de las lesiones pulmonares tras el tratamiento con Amblyomin-X.

Figura 23: Análisis de la tasa de supervivencia de los animales con metástasis en el parénquima pulmonar tratados con Amblyomin-X.

35 Figura 24: Aspecto macroscópico de los tumores dorsales de melanoma B16F10 tratados durante 42 días con Amblyomin-X.

Figura 25 A: Aspecto macroscópico de melanoma dorsal B16F10 en ratones C57BL/6J del grupo de control tratado durante 42 días con solución salina.

40 Figura 25 B: Aspecto macroscópico de los tumores dorsales de melanoma B16F10 en ratones C57BL/6J tratados durante 42 días con Amblyomin-X.

Figura 26: Análisis de las fases del ciclo celular de tumores dorsales de melanoma B16F10 tratados con Amblyomin-X.

45 Figura 27: Análisis de fases del ciclo celular de metástasis pulmonares de los animales tratados con Amblyomin-X.

Figura 28: Determinación de citotoxicidad de linfocitos humanos sanos tratados con diferentes concentraciones de Amblyomin-X.

50 Figura 29: Determinación de los efectos citotóxicos de la heparina de bajo peso molecular en las células B16F10 y SK-MEL-28.

Figura 30: Diseminación de los macrófagos peritoneales tras 1 h de tratamiento con Amblyomin-X 0,3 μ M.

55 Figura 31: Índice fagocítico de macrófagos peritoneales tras 1 h de tratamiento con Amblyomin-X 0,3 μ M, medido con C3b del complemento.

60 Figura 32: Índice fagocítico de macrófagos peritoneales tras 1 hora de tratamiento con Amblyomin-X mediado por la fracción Fc del anticuerpo.

Ejemplo 1: Obtención de ARNm

65 La integridad del ARN total extraído de las glándulas salivales de la garrapata *A. cajennense* se verificó en gel de agarosa en presencia de formaldehído (figura 1).

Ejemplo 2: Aislamiento del ARNm

5 Para aislar el ARNm, se diluyeron 48 µl de ARN total en 500 µl de tampón de Tris 10 mM en presencia de EDTA 1 mM y se sometieron a la columna de afinidad de oligo (dT) celulosa. Se obtuvieron 17,28 µg de ARNm. La relación A_{260}/A_{280} para el ARNm fue de 1,71 (µg/µl). El ARNm extraído, desprovisto de productos de degradación, se utilizó para la construcción de la biblioteca de ADNc (figura 2).

Ejemplo 3: Construcción de la biblioteca de ADNc

10 Mediante la selección en gel de agarosa a partir de la biblioteca de ADNc con insertos de más de 800 pb.

Se seleccionaron algunos clones aleatorios y se digirieron con *EcoRI* y *HindIII*, y se presentó una variedad de insertos de diferentes tamaños (figura 3).

15 **Ejemplo 4: Secuenciación de clones para el mapeo de los transcritos más expresados en las glándulas salivales de las garrapatas**

Sobre la base de las placas de la biblioteca de peso elevado, se prepararon 6 placas de pocillos por el método de lisis alcalina y, de este modo, se secuenciaron 576 clones aleatorios.

20 **Ejemplo 5: Secuenciación de clones y esquema “cebador”**

Entre las secuencias obtenidas, algunos clones presentaban una homología elevada con “serpinas” y, entre ellos, uno mostró características de masa molecular parecidas a un inhibidor de las serina proteasas que se había purificado anteriormente a partir de la saliva de la garrapata *A. cajennense* en el Laboratory of Biochemistry and Biophysics del Butantan Institute. La secuencia completa de este clon se muestra en la figura 4.

Ejemplo 6: Traducción de la secuencia de nucleótidos del clon en la secuencia proteica

30 Mediante un programa disponible en la página web “<http://us.expasy.org/tools/dna.html>”, la secuencia de nucleótidos del clon seleccionado se tradujo en la secuencia de aminoácidos. La secuencia obtenida se representa en la figura 5.

Ejemplo 7: Secuencia de la proteína madura

35 La secuencia obtenida se refiere a la proteína con el péptido señal, y a través de la página <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, fue posible la determinación teórica de dicho péptido, que se encontró entre las posiciones 1 y 28 de esta secuencia de aminoácidos. La secuencia de la proteína madura contiene 108 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 12.295,6 Da y un punto isoelectrico teórico (pI) de 4,67. La secuencia de la proteína madura se representa en la figura 6.

Ejemplo 8: Secuencia 5'-3' del “cebador” construido para la amplificación del clon

45 Sobre la base de la secuencia de la proteína madura, se diseñó un “cebador” para la amplificación del inhibidor de interés, que también tenía una secuencia CTCGAG, que es un sitio para la enzima *XhoI*, tal como ilustra la figura 7.

Ejemplo 9: Amplificación del ADNc que codifica el inhibidor

50 El producto de amplificación obtenido con el “cebador” construido y el “cebador” SP6 presentó una banda de aproximadamente 400 pb. Esta banda se cortó del gel y se purificó.

El ADNc purificado se subclonó dentro del vector y se transformó en bacterias DH5α competentes. El producto se dispuso en placas y, a partir de este procedimiento, se aislaron 20 clones seleccionados aleatoriamente y se sometieron al proceso de extracción con fenol-cloroformo para la evaluación de la presencia de insertos.

55 Entre los clones positivos, 3 se seleccionaron para su amplificación y purificación, y se sometieron a ensayos de restricción con las enzimas *XhoI* y *EcoRI*.

60 Se confirmó la secuencia del clon y el inserto liberado por la digestión se subclonó dentro del vector de expresión que inserta un extremo de seis residuos de histidina en la porción aminoterminal de la proteína recombinante, expresada después de la inducción con IPTG.

La proteína de interés se encontró como corpúsculo de inclusión que, tras la solubilización con urea y β-mercaptoetanol, se purificó en una columna de afinidad de Ni, tal como demuestra el SDS-PAGE de la figura 8.

65 El material eluido por cromatografía en Ni-Sepharose se dializó frente a soluciones con concentraciones

decrecientes de urea (hasta su ausencia). Tras la diálisis, el material se utilizó en los ensayos estructurales y en los ensayos bioquímicos que se presentan a continuación.

5 **Ejemplo 10: Ejemplo comparativo de las estructuras primarias de Amblyomin-X e ixodes**

Sobre la base de la estructura primaria de la Amblyomin-X (deducida de la secuencia de ADN), se llevó a cabo un estudio teórico estructural de la molécula.

10 La Amblyomin-X presenta aproximadamente un 17% de homología cuando se compara con el TFPI-1 y aproximadamente un 18% con respecto al TFPI-2, en ambos casos en humanos. Por otro lado, los estudios estructurales pusieron de manifiesto que la Amblyomin-X presenta aproximadamente un 21% de homología con Ixolaris, una proteína recombinante que se clonó a partir de las glándulas salivales de la garrapata *Ixodes scapularis*.

15 Cuando se comparan las estructuras primarias de la Amblyomin-X y la Ixolaris (GeneStream Align), se verifica que la Amblyomin-X presenta una depleción tanto en la parte aminoterminal, entre los residuos 3 y 13 (numerados según la molécula de Ixolaris) como en la parte carboxiterminal, entre los residuos 121 y 131 (11 aminoácidos). Por otro lado, se producen depleciones de residuos en la parte interna de la molécula (18 aminoácidos), que se muestran en la figura 9.

20 El TFPI humano, como ya se ha mencionado, presenta 3 dominios: el dominio D1, compuesto por los residuos 53 a 103; el dominio D2, compuesto por los residuos 124 a 174, y por último el dominio D3, compuesto por los residuos 222 a 273. Por consiguiente, la estructura primaria de la Amblyomin-X (con sólo 2 dominios) se comparó con cada uno de los dominios de la molécula del TFPI-1 humano.

25 Además, las estructuras parciales de la Amblyomin-X se enviaron a los bancos de datos y se verificó que los "golpes" de homología con los inhibidores de tipo Kunitz están altamente conservados para la parte aminoterminal (residuos 1-61: ANSKAVCNLP KLAGDETCNSN KTEIRWYYNG TACEAFIFKG CGGNDNNFDRV DDCQRLCEEQ). Sin embargo, la parte carboxiterminal (residuos 62 a 108: THFHESPCLI CFKVQDYWILB NDIMKKNLTGI SLKSEEDAD SGEID) presenta homología con proteínas del tipo fosfatasa 2C, proteínas del sistema de cinasas, la alfa-amilasa 3 y de los activadores de las vías MAP cinasas, datos obtenidos a través de un programa de alineaciones múltiples.

35 Al analizar la estructura tridimensional de la Amblyomin-X, obtenida por modelado molecular, se observó que presentaba una homología estructural sólo con el primero de los dominios de los inhibidores de tipo Kunitz que se encuentran en esta familia de las serpinas (residuos 1-61). Prosiguiendo los estudios estructurales de la Amblyomin-X, su estructura secundaria más probable se analizó mediante experimentos de dicroísmo circular y se pudo observar que la Amblyomin-X presenta, de un 55% de estructuras desordenadas, un 10% de hélices alfa y aproximadamente un 35% de estructuras beta, datos que se corroboran con el modelado de esta proteína.

40 **Ejemplo 11: Dosificación de la actividad inhibidora sobre el FXa**

En ensayos con una mezcla de fosfolípidos y un sustrato fluorogénico se pudo comprobar la inhibición del factor Xa y el efecto de la dependencia de la dosis, tal como se puede ver en la figura 10.

45 **Ejemplo 12: Ensayos para prolongar el tiempo de coagulación**

50 El inhibidor recombinante es capaz de prolongar el tiempo de coagulación, ya sea el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) o el tiempo de protrombina (TP). La figura 11a muestra que la prolongación del TTPA fue de 43,4 segundos (control) a 137,5 segundos en presencia de 50 µg del inhibidor recombinante, lo que refleja una inhibición del 60%. La figura 11b muestra una prolongación del TP de 14,3 segundos en ausencia del inhibidor a 89,3 segundos en presencia de 50 µg del inhibidor recombinante, lo que refleja una inhibición teórica de aproximadamente el 85%.

55 **Ejemplo 13: acción de la Amblyomin-X en el tiempo en presencia de fosfolípidos**

60 También se pudo observar que, en los ensayos de coagulación en que se sustituyeron los fosfolípidos por cuerpos apoptóticos producidos en células CHO (derivadas de ovario de hámster chino), el tiempo de coagulación cambió de 129 segundos (control) a 210 segundos en presencia de Amblyomin-X 2,5 µM, tal como se puede observar en la figura 12. Se puede observar la capacidad de la Amblyomin-X para inhibir el efecto procoagulante de los cuerpos apoptóticos.

Ejemplo 14: Aspectos citológicos causados por la Amblyomin-X en células B16F10 6 horas después del tratamiento: análisis de las alteraciones morfológicas y la citotoxicidad

65 Se cultivaron las células tumorales de melanoma B16F10 tratadas con diferentes concentraciones de Amblyomin-X en placas de 96 pocillos. Las alteraciones citotóxicas y la pérdida de adhesión se observaron en primer lugar

citológicamente, y se obtuvieron imágenes mediante Capture System.

El tratamiento de los cultivos celulares de melanoma murino B16F10 con Amblyomin-X presenta un efecto citotóxico dependiente del tiempo y la dosis. Los cultivos de células B16F10 tratados con Amblyomin-X 0,5 μM tras 6 horas mostraron pequeñas y discretas alteraciones citoplasmáticas, como aparición de vacuolas y contracciones de los espacios intercelulares sin presentar desprendimiento de las células tumorales. No se observó una pérdida significativa de adhesión celular. Los datos se muestran en la figura 13.

Ejemplo 15: Aspectos de las alteraciones citológicas en células b16f10 12 horas después del tratamiento con Amblyomin-X

Tras 12 horas de exposición de las células de melanoma a Amblyomin-X 0,5 μM , se observaron alteraciones moderadas consistentes en la contracción de los espacios intercelulares con formación de agregados celulares dispersos en el sobrenadante de cultivo, tal como se puede observar en la figura 14.

Ejemplo 16: Aspectos de las alteraciones citológicas provocadas en células B16F10 24 horas después del tratamiento con Amblyomin-X

Tras 24 horas de tratamiento de las células tumorales B16F10 con Amblyomin-X 0,5 μM , las células presentaron alteraciones significativas de contracción y adhesión, así como se redujeron varios agregados celulares, tal como se observa en la figura 15.

Ejemplo 17: Análisis de la inhibición de la adhesión celular de células de melanoma B16F10 tratadas con diferentes concentraciones de Amblyomin-X.

Tras 24 horas de cultivo de las células B16F10 en presencia de diferentes concentraciones de Amblyomin-X (de 0,3 μM a 0,1 nM) en placas de cultivo de 96 pocillos, se observó una pérdida del 55% de adhesión al sustrato de las células, que se demostró dependiente de la dosis (figura 16).

Ejemplo 18: Efecto de la Amblyomin-X en la viabilidad de las células de melanoma B16F10

Se observó una pérdida de viabilidad para concentraciones comprendidas entre 0,3 μM y 0,1 nM. Se recogió el sobrenadante; el número de células y la viabilidad celular se determinaron por el ensayo de exclusión con azul de tripano. La concentración celular se determinó en una cámara hemocitométrica de Malassez. A estas concentraciones, la viabilidad también fue dependiente de la dosis, y de más del 75% cuando se utilizaron 5 μg . Se dio el porcentaje más elevado de desprendimiento celular, tal como se puede observar en la figura 17.

Ejemplo 19: Análisis de melanoma dorsal B16F10 que crece en ratones C57BL/6J tratados con Amblyomin-X

Se inyectaron $2,5 \times 10^5$ células tumorales B16F10 en ratones por vía subcutánea y, después del 12^º día, se inyectó 1 mg/kg de Amblyomin-X por vía subcutánea hasta el 14^º día en los animales que presentaban tumor dorsal. El mismo volumen de solución salina se administró por la misma vía a los animales del grupo de control después del 12^º día de inoculación de las células tumorales.

Los animales se observaron diariamente y el diámetro del tumor se determinó con un paquímetro. Los animales tratados con Amblyomin-X presentan una disminución significativa del volumen tumoral dorsal en comparación con el grupo de control (figura 18).

En los animales tratados, que se evaluaron macroscópicamente, los tumores dorsales eran más pequeños en cuanto a su pigmentación y volumen medio. Por otro lado, los tumores del grupo de control eran extremadamente grandes, nodulares y ulcerados, y presentaban una extensa zona de necrosis. Los animales inyectados con células tumorales y no tratados presentaron niveles elevados de caquexia durante el tratamiento (figura 19). La tasa de supervivencia (% acumulativo) del grupo tratado en comparación con el no tratado (control) fue de 13 días de promedio. Los animales tratados con Amblyomin-X presentaron un aspecto normal (figura 20).

Ejemplo 20: Número de nódulos tumorales presentes en el parénquima pulmonar tras el tratamiento con Amblyomin-X

Los grupos de ratones C57BL/6J recibieron 5×10^4 células tumorales por vía endovenosa, y tras el 12^º día desde la inyección se sometieron a tratamiento con Amblyomin-X 0,5 mg/kg. Este tratamiento se administró diariamente por vía intraperitoneal durante 14 días y los animales se observaron diariamente.

Tras la necropsia, los animales tratados con Amblyomin-X presentaron una reducción muy significativa del número de nódulos tumorales presentes en el parénquima pulmonar en comparación con el grupo de control (figura 21).

Ejemplo 21: Distribución de tamaños de las lesiones pulmonares tras el tratamiento con Amblyomin-X

El análisis macroscópico del parénquima pulmonar puso de manifiesto que el diámetro medio de los nódulos presentes en el grupo de control varió de 0,1 cm a 0,3 cm. Los animales tratados con Amblyomin-X no sólo mostraron un número menor de lesiones (baja multiplicidad), sino que no presentaron lesiones de más de 0,3 cm. También se pudo observar que el diámetro estaba comprendido entre 0,1 cm y 0,2 cm sin mostrar características de invasión o diseminación (figura 22).

Ejemplo 22: análisis de la tasa de supervivencia de los animales con metástasis en el parénquima pulmonar tratados con Amblyomin-X

La tasa de supervivencia (expresada en % acumulativo) de los animales con metástasis pulmonares tratados con Amblyomin-X en comparación con la del grupo de control (no tratado) fue de 15 días (figura 23).

No se observó pérdida de peso de los animales tratados con Amblyomin-X durante el protocolo terapéutico ni tampoco aumento de la masa tumoral tras este período.

Ejemplo 23: Aspecto macroscópico de tumores dorsales de melanoma en ratones B16F10 tratados durante 42 días con Amblyomin-X

Los animales B16F10 con tumor dorsal recibieron tratamiento diario con Amblyomin-X 1 mg/kg o 0,5 mg/kg después del tercer día desde la inyección de las células tumorales. Los animales con tumor se trataron diariamente por vía subcutánea durante 42 días consecutivos. Los resultados mostraron que el tratamiento es eficaz, con una reducción significativa de la masa y el volumen tumorales en los animales tratados en comparación con los del grupo de control. Se observó que los animales inyectados con células tumorales no presentaban crecimiento tumoral, o incluso se observó desaparición de masa tumoral, probablemente por la inducción de la remisión tumoral. Se diseccionó un grupo de animales y se observó macroscópicamente que los tumores existentes eran pequeños, pigmentados y no nodulares, y que no presentaban zonas de necrosis. También se pudo observar que la irrigación del tumor no aumentó y que no presentaba reclutamiento sistémico de vasos periféricos adyacentes a la lesión. Tampoco se observó neoangiogénesis (figura 24).

Ejemplo 24: Aspecto macroscópico del tumor dorsal de melanoma B16F10 de ratones C57BL/6J (grupo de control y tratados durante 42 días)

Los aspectos histopatológicos de los tumores dorsales del grupo de control que recibieron solución salina durante el protocolo terapéutico mostraron una masa tumoral de alta celularidad, similar a la masa sincicial con una extensa área irrigada por vasos medios y pequeños, así como vasos capilares. Alrededor de la masa tumoral se observó una infiltración inflamatoria discreta de leucocitos monomorfonucleares. Los tumores de los grupos tratados con Amblyomin-X (1 mg/kg) recogidos después del 14^º día del tratamiento mostraron una masa tumoral con baja actividad proliferativa, una cantidad baja de elementos fibrilares de sustentación (poco tejido conjuntivo/estroma) sin infiltración inflamatoria peritumoral. Las lesiones metastásicas pulmonares de este grupo se mostraron como tumores pequeños con celularidad baja en el parénquima pulmonar, que presentaban espesor y deposición alveolares y un pigmento marronoso de tipo melanina. No se observó infiltrado inflamatorio bronquial en estas lesiones. Los tumores dorsales obtenidos de los animales tratados con Amblyomin-X durante 42 días pusieron de manifiesto que las células tumorales están organizadas como en islas permeadas por extensas áreas de necrosis (figura 25 B), de manera diferente que el control (figura 25 A). Por la técnica de tinción con hematoxilina/eosina no se detectaron vasos sanguíneos de nueva formación. Los otros órganos internos analizados, como los riñones, el hígado, el bazo y el corazón, no presentaron alteraciones histológicas. No se observó pérdida funcional ni efectos directos de toxicidad en estos órganos provocados por el tratamiento prolongado con Amblyomin-X.

Se observó la formación de una pequeña cantidad de material de aspecto fibrinilar o exudativo alrededor de la masa tumoral.

Ejemplo 25: Análisis de las fases del ciclo celular de las células de tumores dorsales de melanoma B16F10 de ratones tratados con Amblyomin-X

Evaluación de las fases del ciclo celular: Tras la necropsia de los animales con tumor dorsal o metástasis pulmonares tratados durante 14 días con Amblyomin-X y de los animales del grupo de control que recibieron solución salina, se evaluaron las fases del ciclo celular de los tumores por citometría de flujo y se determinaron los porcentajes de células en las fases sub-G1 o apoptósica, G0/G1, la fase S y la fase G2/M. Los resultados pusieron de manifiesto que las células tumorales obtenidas a partir del tumor dorsal de los animales que recibieron tratamiento con Amblyomin-X se presentaban mayoritariamente en las fases de apoptosis (sub-G1) y quiescentes (G0/G1) y con baja actividad proliferativa (G2/M) (figura 26).

Ejemplo 26: Análisis de las fases del ciclo celular de lesiones metastásicas de melanoma B16F10 de animales tratados con Amblyomin-X

Las células obtenidas a partir de lesiones de las metástasis pulmonares analizadas por citometría de flujo estaban en un número significativo en la fase G2/M del ciclo celular, lo que indica el bloqueo de la capacidad proliferativa de estas células y la eficacia del tratamiento (figura 27).

Ejemplo 27: Determinación de la citotoxicidad de diferentes concentraciones de Amblyomin-X en células humanas sanas

La exposición de células murinas y humanas sanas a diferentes concentraciones de Amblyomin-X durante 24 horas puso de manifiesto que, para los fibroblastos de la piel, linfocitos, macrófagos y neutrófilos, la Amblyomin-X no presenta efectos citotóxicos, y no se observaron muerte celular ni desprendimiento celular en la placa de cultivo (figura 28) en comparación con el tratamiento con heparina (figura 29).

Ejemplo 28: Evaluación de la actividad funcional de macrófagos de animales con melanoma B16F10 y tratados con Amblyomin-X

La evaluación de la actividad funcional de los macrófagos en animales con melanoma B16F10 tratados con Amblyomin-X y en el grupo de control puso de manifiesto que el tratamiento aumenta la actividad fagocítica de los macrófagos y que esta actividad es dependiente del fragmento C3b del sistema del complemento o del receptor de Fc de la inmunoglobulina (figuras 30, 31 y 32).

Ejemplo 29: Pruebas de coagulación

El tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) y el tiempo de protrombina (TP) se evaluaron en presencia y ausencia de Amblyomin-X. Para la realización de estas pruebas se utilizaron "kits" comerciales de coagulación.

El TTPA es la prueba en la que se evalúa la ruta intrínseca de la coagulación, es decir, se controlaron la calicreína plasmática y los factores XII, IX, XI y X.

El control de la prueba se llevó a cabo en ausencia de Amblyomin-X y consistió en una incubación durante 3 min a 37°C de 100 µl de plasma humano sano, 100 µl de cefalina y 100 µl de tampón Tris HCl 0,1 M, pH 8,0, seguido por la recalcificación del medio mediante la adición de 100 µl de CaCl₂ 0,025 M.

El tiempo de formación del coágulo se midió con un coagulómetro semiautomatizado. En los experimentos de inhibición, en lugar de tampón se utilizaron 100 µl de solución de Amblyomin-X preparada en Tris HCl 0,1 M, pH 8,0.

Para la otra prueba de coagulación, TP, se utilizó el mismo equipo. El TP verifica la ruta extrínseca de coagulación, es decir, controla los factores II, V, VII y X.

El control del ensayo se llevó a cabo incubando durante 2 min a 37°C 100 µl de plasma con 100 µl de tampón Tris HCl 0,1 M, pH 8,0, y añadiendo posteriormente 100 µl del reactivo. El tiempo de formación del coágulo se verificó igual que en la prueba mencionada anteriormente. En lugar del tampón, se incubaron 100 µl de solución de Amblyomin-X preparada en tampón Tris HCl 0,1 M, pH 8,0, para evaluar la inhibición.

También se verificó el efecto de la Amblyomin-X sobre el tiempo de coagulación utilizando cuerpos apoptóticos producidos en células CHO como fuente de fosfolípidos.

Ejemplo 30: Acción de la Amblyomin-X sobre el efecto procoagulante de los cuerpos apoptóticos

Se idealizó una curva de calibración de la prueba de coagulación llamada PCA ("Pro Coagulant Activity" o actividad procoagulante) y, para ello, se llevó a cabo una preincubación de 3 min a 37°C para un volumen final de 60 µl de factor VII activado (FVIIa) 1 nM, con factor X humano (FX) 0,25 y CaCl₂ 8,3 mM con diferentes concentraciones de factor tisular recombinante (r-TF) (1,56 - 12,5 ng/ml) en tampón Hepes 250 mM con albúmina bovina (BSA) (1%). A continuación se añadieron 100 µl de una mezcla que contiene plasma humano normal (87,5 µl), fosfatidilserina:fosfatidilcolina PS 30:PC 70 (7,5 µl) y Hepes (50 mM) y la mezcla se incubó durante otros 3 minutos. La reacción se inició mediante la adición de 20 µl de CaCl₂ 250 mM.

La Amblyomin-X se preincubó con cuerpos apoptóticos producidos en células CHO y se observó que el tiempo de coagulación inducida por los cuerpos apoptóticos se prolongó (Sorensen y otros, 2003).

Ejemplo 31: Evaluación de la capacidad antitumoral de la Amblyomin-X en cultivo de linajes tumorales humanos y murinos

Los linajes tumorales: HL-60, K562, U937, YAC-1, JURKAT, Mel-85, Mewo, MCF-7, SW613-12A1, SW613-B3, los

linajes de cáncer de colon SW613-12A1 y SW613 y el linaje de melanoma murino B16F10 se cultivaron en frascos de cultivo de 75 cm³ en medio RPMI-1640 complementado con un 10% de suero bovino fetal, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y los antibióticos estreptomicina 0,1 mg/ml y ampicilina 0,1 mg/ml. Antes de llegar a la confluencia (células adherentes), las células se cultivaron para la amplificación y el mantenimiento de los linajes, se congelaron en medio de cultivo RPMI-1640 que contenía un 10% de dimetilsulfóxido y se mantuvieron en nitrógeno líquido.

Las suspensiones de células adherentes (B16F10, SW613-12A1, SW613-B3 y MCF-7) para todos los procedimientos experimentales se obtuvieron mediante el tratamiento de los frascos de cultivo con tripsina al 0,2% durante 5 minutos y la inactivación con un 10% de suero bovino fetal. Las células desprendidas se centrifugaron dos veces y se volvieron a suspender en medio RPMI-1640 complementado. El recuento de células se llevó a cabo en una cámara de Malassez y la concentración celular se ajustó a 5×10^5 células/ml en medio RPMI-1640 complementado con un 10% de suero fetal bovino y 7 µg de polimixina B.

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de exclusión de azul de tripano, que detectó más del 95% de células viables.

Ejemplo 32: Tratamiento de células tumorales con Amblyomin-X

Las células a una concentración de 2×10^5 se cultivaron en placas de 96 pocillos y se mantuvieron durante 24 horas en un esterilizador de CO₂ a 37°C. A continuación, las placas se centrifugaron durante 5 minutos a 2.000 rpm a 4°C, se excluyó el sobrenadante y se añadieron diferentes concentraciones de Amblyomin-X, de 0,3 µM a 0,3 nM, diluida en medio de cultivo RPMI-1640 complementado con 7 µg de polimixina B. Después de 6, 12 y 24 horas, se observaron las alteraciones citológicas y se documentaron gráficamente en el sistema de captura de imágenes.

Ciclo Celular

La citometría de flujo aplicada al estudio del ciclo celular registra los parámetros cinéticos de las células, que muestran el índice de ADN, la ploidia, la fracción de proliferación celular y el porcentaje de células que se encuentran en las fases S y G2/M, lo que indica parámetros univariados o multivariados para el pronóstico y los posibles procedimientos terapéuticos. El análisis del porcentaje de células proporciona el porcentaje de células que sintetizan ADN ("índice de marcaje"), la duración de la fase S (Ts) y el tiempo de duplicación potencial (Tpot).

Ejemplo 33: Determinación del contenido de ADN

Se congelaron inmediatamente alícuotas de las suspensiones de células tumorales tratadas y no tratadas con Amblyomin-X en tampón de citrato (2 mM), sacarosa 25 mM y dimetilsulfóxido al 0,05%, y se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización.

Tras descongelar las muestras en un baño de hielo, las células se incubaron con 375 µl de tripsina 0,03 g/l durante 10 minutos a temperatura ambiente y se neutralizaron con el inhibidor de la tripsina 0,5 g/l, ribonucleasa A 0,1 g/l y espermina 1,2 g/l. Las muestras se transfirieron a tubos de citometría de flujo y se analizaron el número de células en diferentes fases del ciclo, el nivel de apoptosis (sub-G1) y el contenido de ADN en la fase S.

Ejemplo 34: Determinación de las fases del ciclo celular

Se centrifugaron dos veces suspensiones celulares (10^6 /ml) de células normales y de los linajes tumorales a 3.000 rpm a 4°C con una solución de PBS y se volvieron a suspender en 200 µl de solución de yoduro de propidio (20 µl/ml) que contenía 20 µl de Triton X-100 y 4 mg de ARNasa A durante treinta minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. A continuación, las muestras se transfirieron a tubos de citometría y se capturaron imágenes en un citómetro de flujo. Se analizaron las fases del ciclo celular de las fases premitótica y postmitótica (G0-G1, fase S y G2-M).

Ejemplo 35: Cultivo de linajes tumorales e implantación tumoral en animales (ratones)

Las suspensiones celulares adherentes (B16F10) utilizadas para la implantación en el flanco dorsal de los animales se obtuvieron tras el tratamiento de los frascos de cultivo con tripsina al 0,2% durante 5 minutos y la inactivación con suero bovino fetal al 10%. Las células desprendidas se centrifugaron (2.000 rpm) dos veces y se volvieron a suspender en medio RPMI-1640 complementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado a 56°C durante 1 h, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y los antibióticos estreptomicina 0,1 mg/ml y ampicilina 0,1 mg/ml. El recuento de células se llevó a cabo en una cámara de Malassez y la concentración celular se ajustó a 5×10^4 células/ml.

Ejemplo 36: Crecimiento de tumores dorsales primarios y evaluación de las metástasis internas

Se utilizaron grupos de 10 ratones mantenidos en las instalaciones de cuidado de animales de laboratorio y

pertenecientes al linaje C57BL/6J. Los animales se mantuvieron con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, a una temperatura constante de 20°C, con agua filtrada y esterilizada y comida a voluntad.

5 Para los experimentos de crecimiento de tumores dorsales primarios, se inyectaron $2,5 \times 10^4$ células tumorales de melanoma murino B16F10 en la parte dorsal de los ratones (grupos de 10 animales) por vía subcutánea. Para evaluar las metástasis internas, los grupos de ratones C57BL/6J recibieron 5×10^4 células tumorales B16F10 por vía endovenosa a través del plexo venoso retroorbitario ocular. Después del 12º día desde la inoculación, este grupo de animales se trató con 0,5 mg/kg de Amblyomin-X administrada por vía intraperitoneal, y se observaron hasta el 14º día de tratamiento.

10 Los animales que recibieron células tumorales por vía subcutánea y que presentaban tumores dorsales después del 12º día se trataron con 1 mg/kg de Amblyomin-X. Se observaron diariamente hasta que se anestesiaron y sacrificaron, momento en que se midieron los tumores con un paquímetro. Los tumores presentaban un diámetro medio de 0,5 cm. Se inició el tratamiento con Amblyomin-X.

15 En el grupo de control, los animales recibieron solución salina por la misma vía que en el tratamiento y después del 14º día de tratamiento. Los animales se anestesiaron y sacrificaron por dislocación cervical. Se les practicó una necropsia y se analizaron los tumores dorsales, y se identificaron, midieron y documentaron gráficamente las lesiones internas macroscópicas. Se analizaron muestras de los tumores de los diferentes grupos de tratamiento y del grupo de control (sin tratar) con el fin de determinar el contenido de ADN, el ciclo celular y las características anatomopatológicas.

Ejemplo 37: Observación del crecimiento tumoral

25 Tras la inyección de las células B16F10, se midió el crecimiento tumoral con un paquímetro y se documentó gráficamente a diario.

30 Se llevaron a cabo medidas longitudinales y transversales de los tumores (dos medidas para cada parámetro). Se calcularon el área y el volumen medio de los tumores a través de las siguientes ecuaciones: $A = \pi R^2$ y $V = 4/3\pi R^3$. Los animales que recibieron células tumorales por vía endovenosa se anestesiaron y sacrificaron en cada fase del tratamiento, tras lo cual se les practicó una necropsia. Se contaron y midieron los nódulos tumorales macroscópicos presentes en los órganos internos.

Ejemplo 38: Determinación de la actividad citotóxica

35 La viabilidad celular de los linajes celulares y de las células tumorales tratadas con diferentes concentraciones de Amblyomin-X comprendidas entre 0,03 nM y 0,3 µM y heparina sódica de 80 a 0,0015 µg se determinó por el método colorimétrico MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio). El método se basa en la reducción del MTT a formazán por parte de las células vivas. La determinación de la sensibilidad a diferentes dosis de Amblyomin-X se optimizó según las normas establecidas por el National Cancer Institute de EE.UU. (NCI). La actividad citotóxica de la Amblyomin-X se determinó en suspensiones de los linajes celulares y de las células tumorales (*ex vivo*), separadas quirúrgicamente y en condiciones estériles incubadas en placas de 96 pocillos. A estas células se le añadieron 10 µl de MTT (5 mg/ml) y a continuación se incubaron durante 3 horas en un esterilizador que contenía un 5% de CO₂ a 37°C. A continuación, se retiró el medio y se añadieron 100 µl de dimetilsulfóxido para la disolución de los cristales de formazán formados y presentes en forma de precipitado. Se controló la absorbencia a 540 nm.

Ejemplo 39: Obtención de macrófagos peritoneales

50 Tras tratar a los ratones con melanoma B16F10 y el grupo de control (que recibió solución salina) con Amblyomin-X, los animales se anestesiaron y sacrificaron por dislocación cervical. Se diseccionó la cavidad abdominal de los animales tratados y de control y se inyectaron 2 ml de solución salina que contenía 5.000 U de heparina fría. La cavidad se masajó e inmediatamente a continuación se recogió el lavado peritoneal y se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. La suspensión celular se volvió a suspender en medio de cultivo RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10% y el número de células se ajustó a 10^6 /ml en cámara hemocitométrica de Malassez.

60 Se cultivaron alícuotas de la suspensión de macrófagos en placas esféricas previamente esterilizadas, se sumergieron en medio de cultivo RPMI-1640 y se mantuvieron en placas de 12 pocillos incubadas en presencia y ausencia de 10^5 *Candida albicans*, 10^5 eritrocitos de oveja o tratados con C3bB o con la porción Fc de la inmunoglobulina. Tras 24 horas, las placas se fijaron y se tiñeron, y se contó el número de células adherentes y de partículas fagocíticas.

Ejemplo 40: Cultivo de fibroblastos de piel humana

65 Se recogieron asépticamente fragmentos de piel humana (de aproximadamente 1 cm x 1 cm) previamente

seleccionados y se colocaron inmediatamente en un tubo cónico estéril que contenía medio de cultivo Ham-F12 con un 20% de suero bovino fetal. Cada fragmento se transfirió a una placa de Petri de 35 mm que contenía medio de cultivo para el lavado y la eliminación del exceso de sangre. El tejido graso y degenerativo se retiró con tijeras y pinzas. El fragmento "limpio" se cortó en fragmentos más pequeños que se distribuyeron en 3 placas de Petri (\pm 15 trozos cada una) que contenía medio de cultivo Ham-F12 complementado con un 10% de suero fetal bovino.

Las placas se mantuvieron en un esterilizador humidificado a 37°C y un 5% de CO₂ y se examinaron en un microscopio invertido 3 veces a la semana. El medio de cultivo se cambió con la misma frecuencia. Cuando llegaron a la subconfluencia, las células se expusieron a tripsina (tripsina al 0,2%) durante 5 minutos y la inactivación se llevó a cabo con suero bovino fetal al 10%. Las células se centrifugaron durante 10 minutos a 2.000 rpm a 4°C y se introdujeron en frascos de 25 cm².

Tras el crecimiento y la expansión celulares se cultivaron 10⁵ fibroblastos en placas de 96 pocillos durante 24 horas. A continuación, el cultivo se trató con Amblyomin-X diluida en RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal al 10% y 7 µg/ml de polimixina B. Como control, se aplicó el tratamiento con heparina sódica en las mismas concentraciones o con medio de cultivo completo.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó por el método de varianza ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer. Los valores se expresaron como mediana \pm desviación estándar, considerándose *p < 0,05 como valores significativos.

Referencias:

Disponibles en:

www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/network/netblast
www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbroser.cgi
www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html
www.expasy.org
www.cbs.dtu.dk/services/signalP/

Barenholz Y, Gibbes D, Litman BJ, Goll J, Thompson TE, Carlson RD. A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles. *Biochemistry*; 16(12):2806-10, 1977.

BELL, D.A.; TAYLOR, J.A.; PAULISON, D. F.; ROBERTSON, CN.; LUCIER, G.W. Genetic risk and carcinogen exposure: A common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 1159-1164, 1993.

Bergqvist D. Venous thromboembolism in cancer patients: expanding horizons *Semin Thromb Hemost.*; 28 supl. 3:19-23, 2002.

Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor gene disruption. *Blood Coagul. Fibrinolysis* supl. 1: S89-92, 1998.

Budillon A. Molecular genetics of cancer. *Oncogenes and tumor suppressor genes. Cancer.*, 76(10): 1869-73, 1995.

Chand HS, Schmidt AE, Bajaj SP, Kisiel W. Structure function analysis of the reactive site in the first kunitz- type domain of human tissue factor pathway inhibitor-2. *J Biol Chem.* 23; 279 (17): 17500-7. Epub, Erratum en: *J Biol Chem* 4; 279 (23):24906, 2004.

Cottrino J, In situ detection of expression of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nature Medicine*, 2: 210-492, 1996.

DECLERCK, Y.A. & IMREM, S. - Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. *Eur. J. Cancer*, 30A: 2170-80, 1994.

DUKE, R.C; OJCIUS, D.M.; YOUNG, J. D. -E. Cell suicide in health and disease. *Scientific American*, 275(6): 48-55, 1996.

Edward RL, Human Tumor Procoagulation. *Thromb Haemost* 69: 205-131; 1993.

FEARON, E.R. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science*, 278: 1043-50, 1997.

Fernandez PM, Patierno SR, Rickles FR. Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis. *Semin Thromb Hemost*; 30 (1): 31-44, 2004.

- Gale AJ, Gordon SG. Update on tumor cell procoagulant factors. *Acta Haematol*; 106 (1-2):25-32, 2001.
- Goel HL, Languino LR. Integrin signaling in cancer. *Cancer Treat Res.*; 119: 15-31, 2004.
- 5 Gordon SG: Cancer cell pro coagulants and their implications. *Hematol Oncol Clin North Am.* 6: 1539-74,1992
- Gouin-Thibaut I, Samama MM. Venous thrombosis and cancer. *Ann Biol Clin* 58 (6): 675-82, 2000.
- 10 GREAVES, M. Dying for a living. In: *Cancer the evolutionary legacy.* Oxford University Press, 196-203, 2000.
- Hermo H Jr., Chemical carcinogenesis: tumor initiation and promotion. *Occup Med.*, 2(1): 1-25, 1987.
- 15 Hoffman R, Haim N, Brenner B. Cancer and thrombosis revisited. *Blood Rev.*; 15 (2): 61-7, 2001.
- Kamei S, Petersen LC, Sprecher CA, Foster DC, Kisiel W. Inhibitory properties of human recombinant Arg24->Gln type-2 tissue factor pathway inhibitor (R24Q TFPI-2). *Thromb Res.* 1; 94 (3):147-52, 1999.
- 20 Lee AY, Levine MN. Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes. *Circulation* 17; 107(23 suppl. 1):117-21, 2003.
- Loreto MF, De Martinis M, Corsi MP, Modesti M, Ginaldi L. Coagulation and cancer: implications for diagnosis and management. *Pathol Oncol Res*; 6 (4): 301-12, 2000.
- 25 Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, Doi T, Shimotohno K, Harada T, Nishida E, Hayashi H, Sugano S. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene*; 22(21):3307-18, 2003.
- 30 MEYER,T.; HART, I.R. Mechanisms of tumor metastasis. *European Journal of Cancer*, 34 (2): 214-221, 1998.
- Moussa SA. Antithrombotics in thrombosis and cancer., *Expert Rev Cardiovasc Ther.*,1(2): 283-91,2003
- Ornstein DL, Zacharski LR Cancer, thrombosis, and anticoagulants. *Curr Opin Pulm Med.*, 6 (4): 301-8, 2000
- 35 Rao LV, Ruf W. Tissue factor residues LysI β Δ and LysI β β are essential for rapid formation of the quaternary complex of tissue factor VIIa with Xa tissue factor pathway inhibitor. *Biochemistry*; 34 (34): 10867-71, 1995.
- Ribeiro, J.M.C. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists, *Infect Agents Dis.*; 4 (3):143-52, 1995.
- 40 Rickels F: Hemostatic alterations in cancer patients. *Cancer Metast. Rev* 11: 239; 1992.
- RUOSLAHTI, E. How cancer spreads. *Scientific American*, 275 (3): 72-77, 1996.
- 45 Sandset PM, Bendz B. Tissue factor pathway inhibitor: clinical deficiency states. *Thromb Haemost*; 78 (1): 467-70, 1997.
- Schafer AI, Levine MN, Konkle BA, Kearon C. Thrombotic disorders: diagnosis and treatment *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*; 520-39, 2003
- 50 Sekine I, Yamamoto N, Kunitoh H, Ohe Y, Tamura T, Kodama T, Saijo N. Cancer Treatment of small cell lung cancer in the elderly based on a critical literature review of clinical trials. *Cancer Treat Rev.*, -30 (4): 359-68, 2004.
- Sorensen BB, Rao LV, Tomehave D, Gammeltoft S, Petersen LC. Antiapoptotic effect of coagulation factor VIIa. *Blood.* 102(5): 1708-15, 2003.
- 55 Sorensen HT, Johnsen SP, Norgard B, Zacharski LR, Baron JA. Cancer and venous thromboembolism: a multidisciplinary approach. *Clin Lab.*; 49 (11-12): 615-23, 2003.
- 60 Sutherland DE, Weitz IC, Liebman HA. Thromboembolic complications of cancer: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Am J Hematol*; 72 (1): 43-52, 2003.
- Tsao AS, Kim ES, Hong WK. CA Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J Clin.*/ 54(3): 150-80, 2004 Wainscoat JS, Fey MF. Assessment of clonality in human tumors: a review. *Cancer Res.*50 (5): 1355-60, 1990.
- 65 Zacharski LR, Pathways of coagulation, fibrinolysis activation in malignancy. *Semin Thromb Hemostasis* 18: 104;

1992.

Zacharski LR. Malignancy as a solid-phase coagulopathy: implications for the etiology, pathogenesis, and cancer treatment. *Semin Thromb Hemost.* 29(3) 317-320, 2003.

5

Listado de secuencias

<110> Uniao Quimica Farmaceutica Nacional SA; et all

10 <120> Procedimiento para la obtención de un inhibidor de la proteasa de tipo Kunitz sobre la base de una biblioteca de ADNc de las glándulas salivales de la garrapata *Amblyomma cajennense*: secuencia de oligonucleótidos de clon y secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante, proteína recombinante, procedimiento para determinar la actividad inhibidora sobre el factor X activado, procedimiento para determinar la actividad anticoagulante en el plasma, procedimiento para determinar la actividad apoptósica en el linaje de células tumorales murinas y humanas, procedimiento para determinar la actividad antimetastásica en un tumor de melanoma, procedimiento para determinar la actividad anticancerosa, *in vitro* e *in vivo*, utilización de la recombinante en diferentes mecanismos homeostáticos (coagulación y respuesta inmunitaria), antiproliferativos, antiapoptósicos y antiangiogénicos.

20 <130> PI0406057-1

<150> BR PI0406057-1

<151> 2004-09-15

25 <160> 4

<170> Microsoft Word 2000

<210> 1

30 <211> 504

<212> PRT

<213> *Amblyomma cajennense*

<220>

35 <223> Secuencia nucleotídica de un inhibidor de la proteasa de tipo Lunitz sobre la base de una biblioteca de ADNc de las glándulas salivales de una garrapata *Amblyomma cajennense*. Secuencia completa del clon seleccionado.

<400> 1

40

caggaaaacg ttgcactcag aaatgcgcca acttgccgtt ctagcgctcg taatcttcac	60
gggcatgtgt gttgaatcac agtcggcgaa cagcaaggca gtttgcaact tgccaagct	120
tcgaggagac gaaacatgca gcaacaaaac tgagattcgc tggattaca acggaacggc	180
ttgcgaagct ttcatttca agggctgtgg tggaaacgac aataatttcg acagggtcga	240
cgactgcaa aggctgtgtg aggagcaaac acactttcac ttcgagtcac cgaattgat	300
ttgtttcaa gtacaggact attggatact aaacgatatt atgaagaaaa acctcactgg	360
aatttccta aaaagtgagg aagaggatgc agattctgga gaaattgatt gagtttgaag	420
caattgattg agtttgaaga atgtacttta ataaacttct ttaaaatcaa aaaaaaaaaa	480
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa	504

<210> 2

<211> 129

45 <212> PRT

<213> *Amblyomma cajennense*

<220>

50 <223> Traducción de la secuencia de nucleótidos de la secuencia de un inhibidor de la proteasa de tipo Kunitz sobre la base de una biblioteca de ADNc de las glándulas salivales de la garrapata *Amblyomma cajennense* para la secuencia proteica.

ES 2 410 160 T3

<400> 2

```

Met Arg Gln Leu Ala Val Leu Ala Leu Val Ile Phe Thr Gly Met Cys
      5                               10
Val Glu Ser Gln Ser Ala Asn Ser Lys Ala Val Cys Asn Leu Pro Lys
      20                               25                               30
Leu Ala Gly Asp Glu Thr Cys Ser Asn Lys Thr Glu Ile Arg Trp Tyr
      35                               40                               45
Tyr Asn Gly Thr Ala Cys Glu Ala Phe Ile Phe Lys Gly Cys Gly Gly
      50                               55                               60
Asn Asp Asn Asn Phe Asp Arg Val Asp Asp Cys Gln Arg Leu Cys Glu
      65                               70                               75                               80
Glu Gln Thr His Phe His Phe Glu Ser Pro Lys Leu Ile Cys Phe Lys
      85                               90                               95
Val Gln Asp Tyr Trp Ile Leu Asn Asp Ile Met Lys Lys Asn Leu Thr
      100                              105                              110
Gly Ile Ser Leu Lys Ser Glu Glu Glu Asp Ala Asp Ser Gly Glu Ile
      115                              120                              125
Asp

```

5

<210> 3
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Amblyomma cajennense

10

<220>
 <223> Secuencia de la proteína madura

15

<400> 3

```

Ala Asn Ser Lys Ala Val Cys Asn Leu Pro Lys Leu Ala Gly Asp Glu
      5                               10                               15
Thr Cys Ser Asn Lys Thr Glu Ile Arg Trp Tyr Tyr Asn Gly Thr Ala
      20                               25                               30
Cys Glu Ala Phe Ile Phe Lys Gly Cys Gly Gly Asn Asp Asn Asn Phe
      35                               40                               45
Asp Arg Val Asp Asp Cys Gln Arg Leu Cys Glu Glu Gln Thr His Phe
      50                               55                               60
His Phe Glu Ser Pro Lys Leu Ile Cys Phe Lys Val Gln Asp Tyr Trp
      65                               70                               75                               80
Ile Leu Asn Asp Ile Met Lys Lys Asn Leu Thr Gly Ile Ser Leu Lys
      85                               90                               95
Ser Glu Glu Glu Asp Ala Asp Ser Gly Glu Ile Asp
      100                              105

```

20

<210> 4
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Amblyomma cajennense

25

<220>
 <223> Secuencia 5'-3' del cebador construido para la amplificación del clon seleccionado para la expresión.
 <400> 4

```

Cys Thr Cys Gly Ala Gly Gly Cys Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala
      5                               10                               15
Ala Gly Gly Cys Ala Gly Thr Thr Thr Gly Cys
      20                               25

```

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico aislado que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº:1.
- 5 2. Ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico codifica un inhibidor de tipo Kunitz del factor Xa (FXa).
3. Polipéptido purificado que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº:3.
- 10 4. Polipéptido según la reivindicación 3, en el que el polipéptido comprende una actividad seleccionada de entre el grupo constituido por:
 - (i) disminuir la coagulación mediada por FXa, en el que la disminución se produce en presencia de fosfolípidos;
 - 15 (ii) promover la apoptosis de las células B16F10;
 - (iii) promover la apoptosis de las células SK-MEL-28;
 - 20 (iv) disminuir la masa tumoral en un ratón C57BL/6J implantado con células tumorales B16F10;
 - (v) disminuir la metástasis tumoral en un ratón C57BL/6J implantado con células tumorales B16F10;
 - (vi) disminuir la angiogénesis en un ratón C57BL/6J implantado con células tumorales B16F10; y
 - 25 (vii) aumentar la actividad fagocítica de los macrófagos en un ratón C57BL/6J implantado con células tumorales B16F10.
5. Polipéptido purificado según la reivindicación 3, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº:3.
- 30 6. Polipéptido purificado según la reivindicación 3 o 4, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº:2.
7. Polipéptido purificado según la reivindicación 6, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº:2.
- 35 8. Composición farmacéutica que comprende el polipéptido según la reivindicación 3 o 6.
9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, para su utilización en el tratamiento del cáncer en un individuo.
- 40 10. Polipéptido según la reivindicación 3 o 6, para su utilización en el tratamiento del cáncer en un individuo.
11. Polipéptido según la reivindicación 3 o 6, para su utilización en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 10, en el que el tratamiento del cáncer comprende además un tratamiento quimioterápico.
- 45 12. Polipéptido según la reivindicación 3 o 6, para su utilización en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 10, en el que el tratamiento del cáncer comprende además un tratamiento de radioterapia.
13. Polipéptido según la reivindicación 3 o 6, para su utilización en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 10, en el que el tratamiento del cáncer está asociado con una angiogénesis tumoral disminuida en un individuo.
- 50 14. Polipéptido según la reivindicación 3 o 6, para su utilización en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 10, para la utilización en la disminución de la progresión tumoral en un individuo.
15. Polipéptido según la reivindicación 3 o 6, para su utilización en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 10, para la utilización en la disminución de la metástasis tumoral en un individuo.
- 55 16. Polipéptido según la reivindicación 3 o 6, para su utilización en el tratamiento del cáncer según la reivindicación 10, para la utilización en el aumento de la actividad fagocítica en un individuo.
- 60 17. Método *in vitro* de producción de un inhibidor de tipo Kunitz del factor Xa (FXa), comprendiendo el método el cultivo de una célula hospedadora que comprende un vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 1 en condiciones que dan como resultado la expresión del inhibidor codificado por el ácido nucleico.
- 65 18. Método según la reivindicación 17, que comprende además la purificación del inhibidor a partir de las células hospedadoras o del sobrenadante de cultivo de células hospedadoras.

FIGURA 1

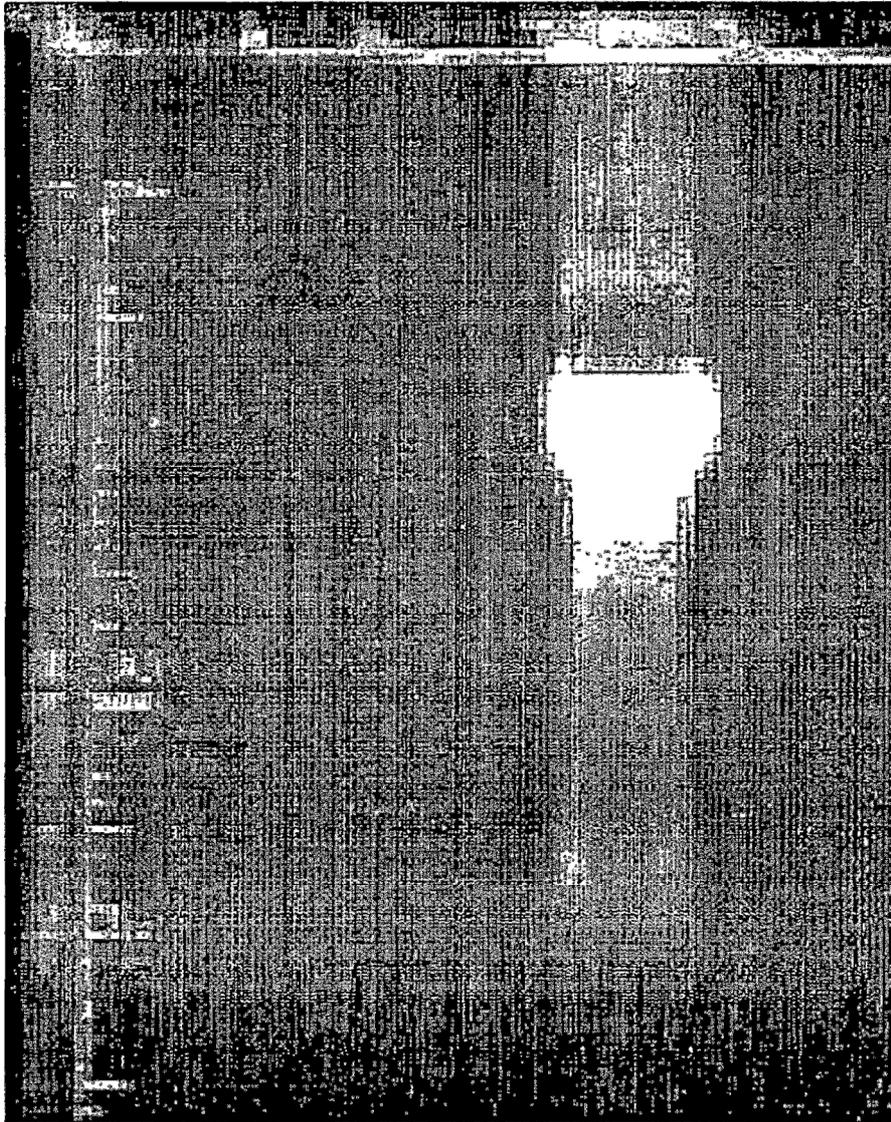
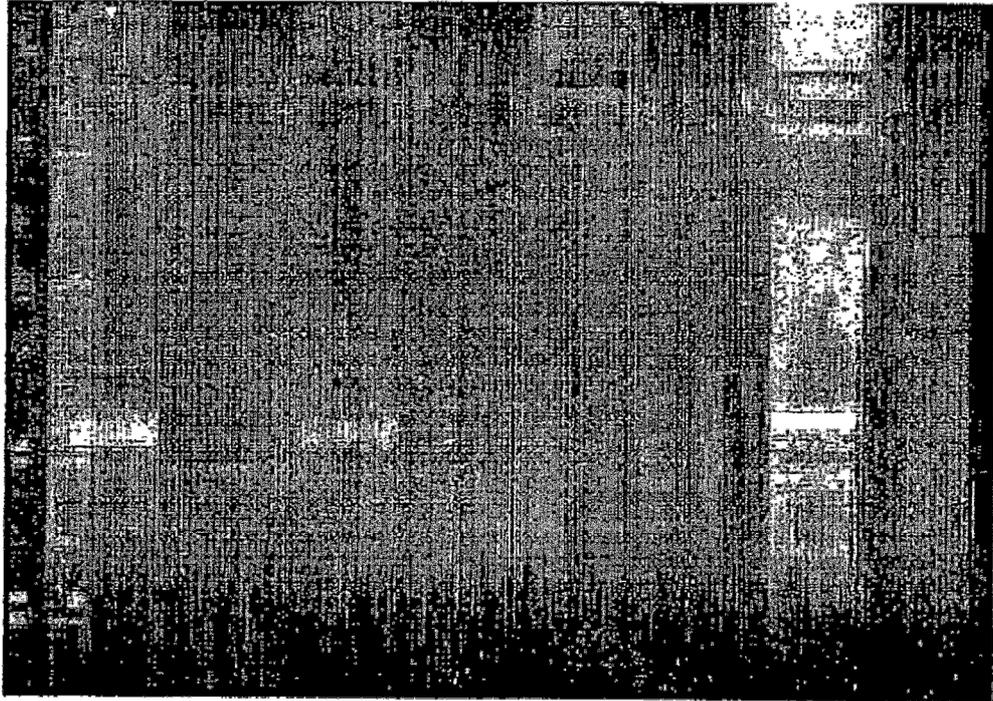


FIGURA 2



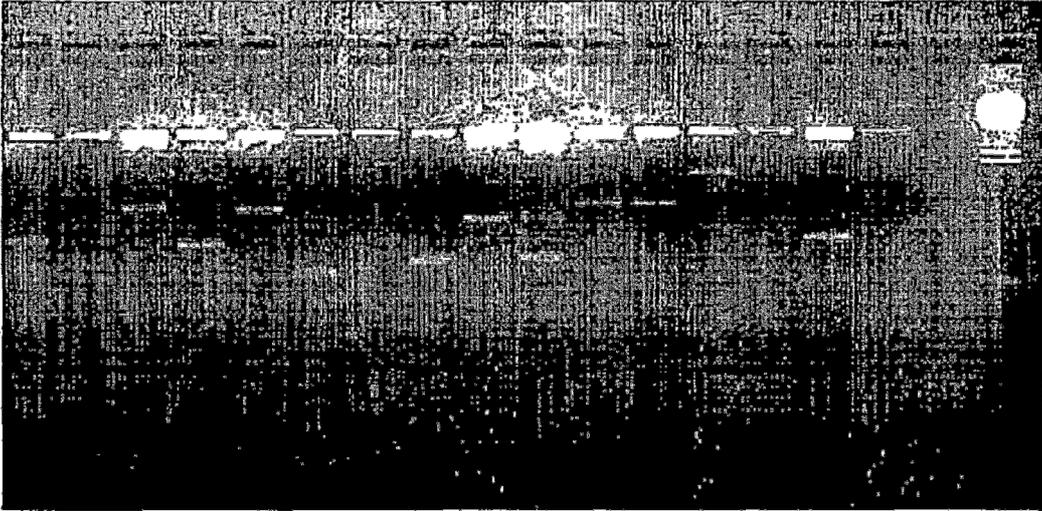
1

2

3

4

FIGURA 3



01 02 03 04 05 06 07 08 09 10 11 12 13 14 15 16 17 18

FIGURA 4

**caggaaaacgttgcactcagaaatgcgccaacttgccgttctagcgct
cgtaatcttcacgggcatgtgtgttgaatcacagtcggcgaacagcaa
ggcagtttgcaacttgcccaagcttgcgggagacgaaacatgcagcaa
caaaactgagattcgctggtattacaacggaacggcttgogaagctt
catattcaagggtgtggtggaaacgacaataatttcgacagggtcga
cgactgccaaaggctgtgtgaggagcaaacacactttcacttcgagtc
accgaaattgatttgtttcaaagtacaggactattggatactaaacga
tattatgaagaaaaacctcactggaatccctaaaaagtgaggaaga
ggatgcagattctggagaaattgattgagtttgaagcaattgattgag
tttgaagaatgtactttaataaacttctttaaaatcaaaaaaaaaaaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa**

FIGURA 5

1	11	21	31
MRQLAVLALV	IFTGMCVESQ	SANSKAVCNL	PKLAGDETCS
41	51	61	71
NKTEIRWYYN	GTACEAFIFK	GCGGNDNNFD	RVDDCQRLCE
81	91	101	111
EQTHFHFESP	KLICFKVQDY	WILNDIMKKN	LTGISLKSEE
121			
EDADSGEID			

FIGURA 6

1	11	21	31
ANSKAVCNLP	KLAGEDETCSN	KTEIRWYYNG	TACEAFIFKG
41	51	61	71
GCGNDNNFDR	VDDCQRLCEE	QTHFHFESPK	LICFKVQDYW
81	91	101	
ILNDIMKKNL	TGISLKSEEE	DADSGEID	

FIGURA 7

CTC GAG GCG AAC AGC AAG GCA GTT TGC

FIGURA 8

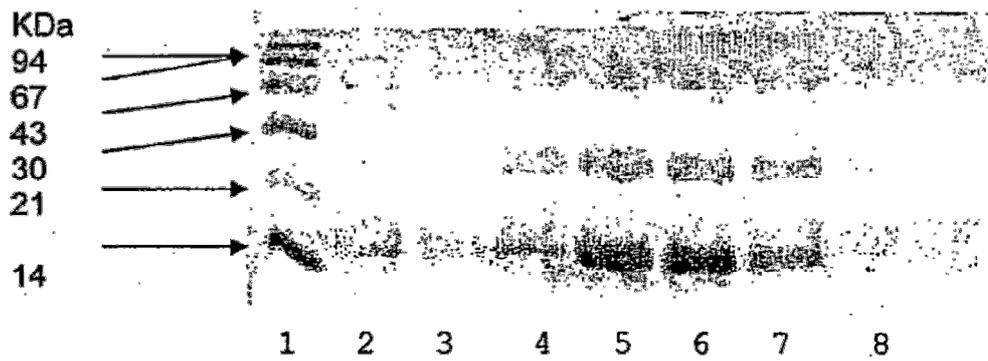


FIGURA 9

```

                                10      20      30
40
Amblyomin-X  AN-----SKAVCNLPKLAGDETC SNKTEIRWYINGTA--
CEAFIFKGC GNDNN
                :.          : . : : . . : : . . : : .
::          : : : : :
Ixolaris     AERVSEMDIYEFESWV SCLDPEQV---
TCESQEGTHASYNRKTGQCEEQKGTECGGGENH
                                10      20      30      40
50

                                50      60      70      80
90
Amblyomin-X  FDRVDDCQRLCEEQTHFH FESPKLICFKVQDY-----WIL--
NDIMKKNLT--GIS
                :. . : : : : : : : : : : :
:. . . : : :
Ixolaris     FETLLKCNE SCND-----
APKPPCSLEVDYGVGRANI PRWYYDTNNATCEMFTYGGIT
                                60      70      80      90
100          110

                                100
Amblyomin-X  -----LKSEEDADSGE-----ID
                : : : : : . . : :
Ixolaris     GNKNFES EEECKETCKGF SLLKKNVTIN
                                120      130      140

```

FIGURA 10

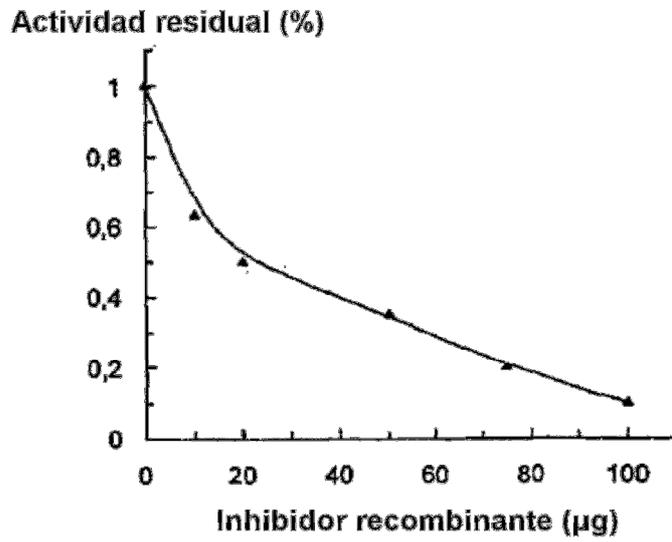
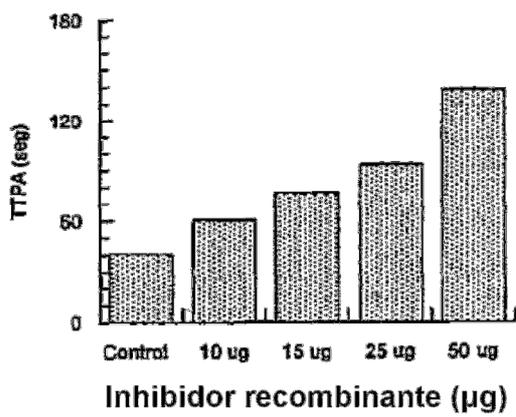
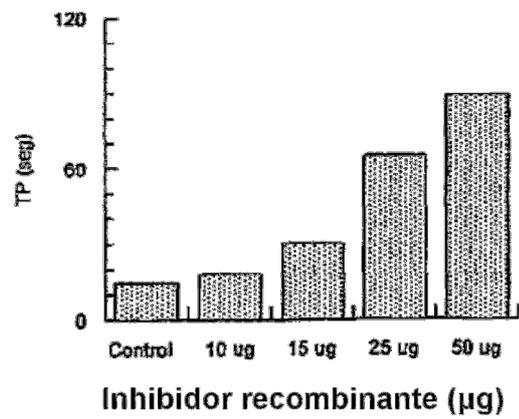


FIGURA 11A y 11 B



A



B

FIGURA 12

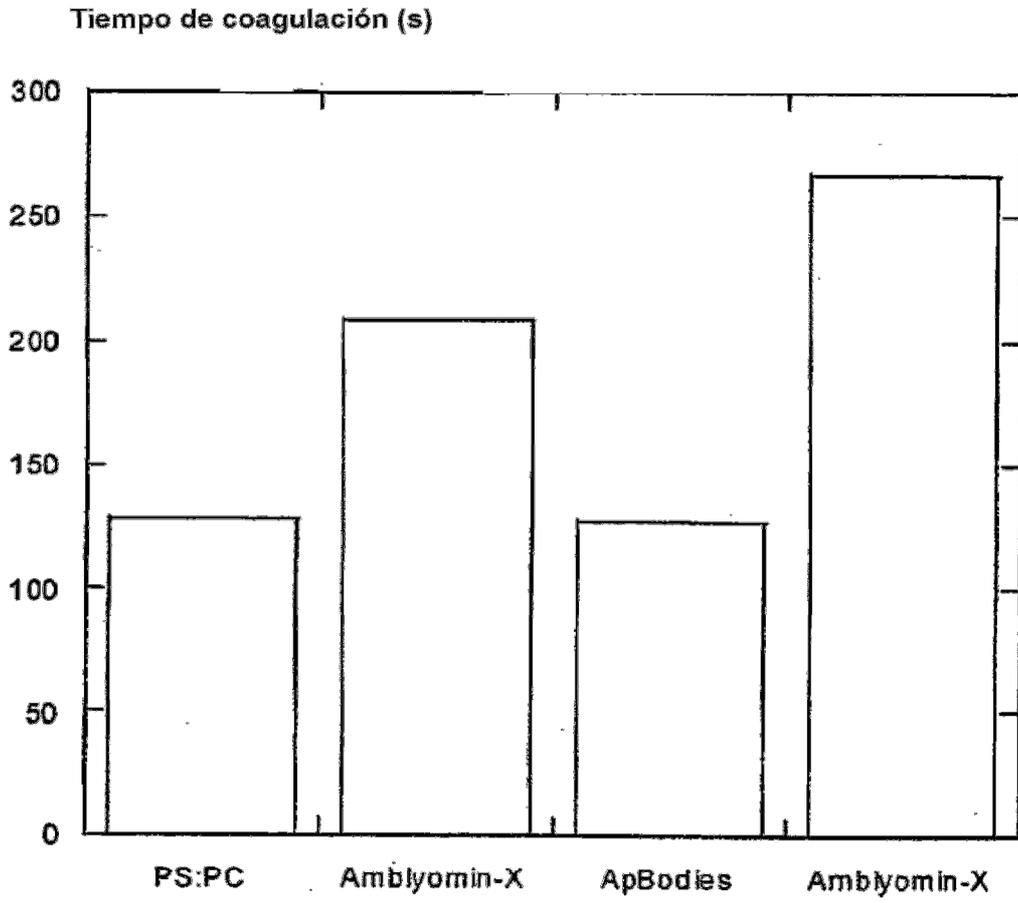


FIGURA 13

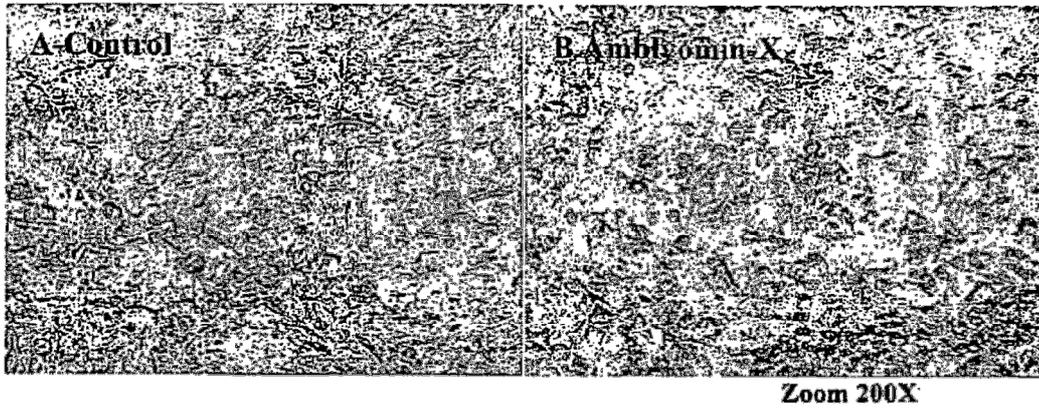


FIGURA 14

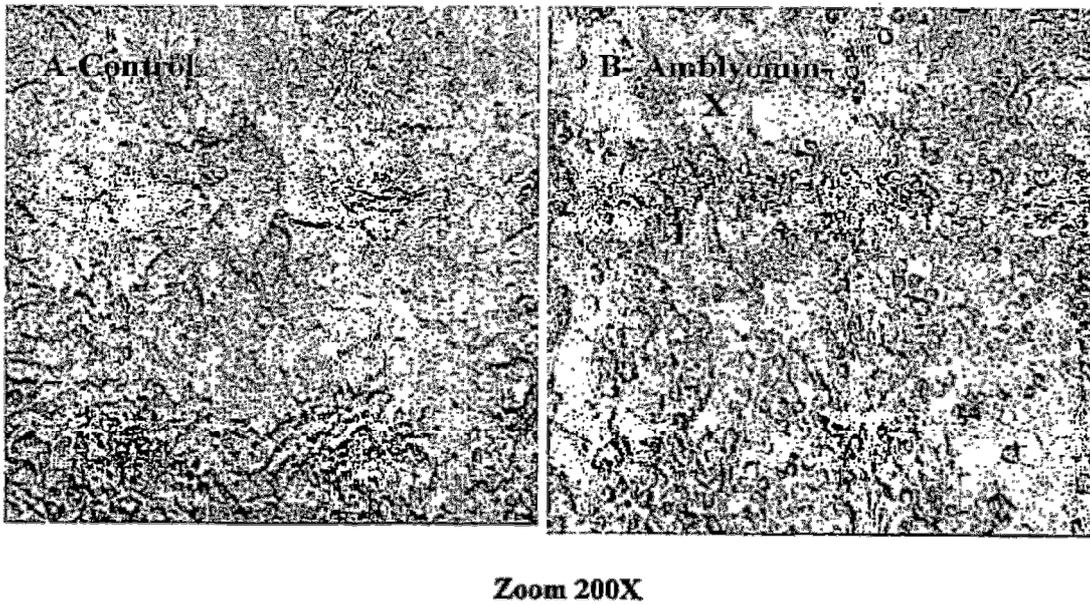


FIGURA 15

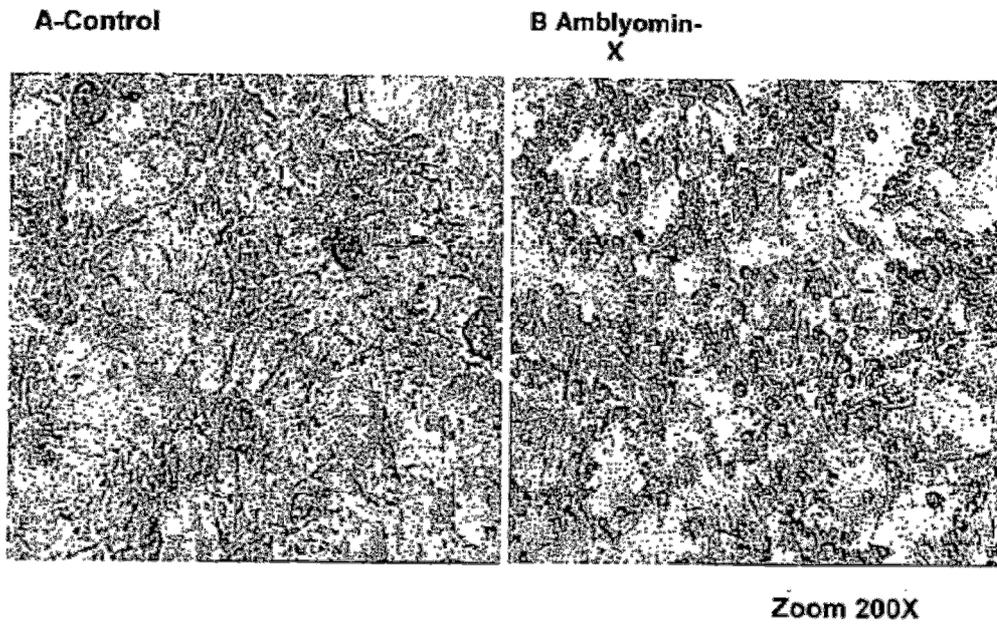


FIGURA 16

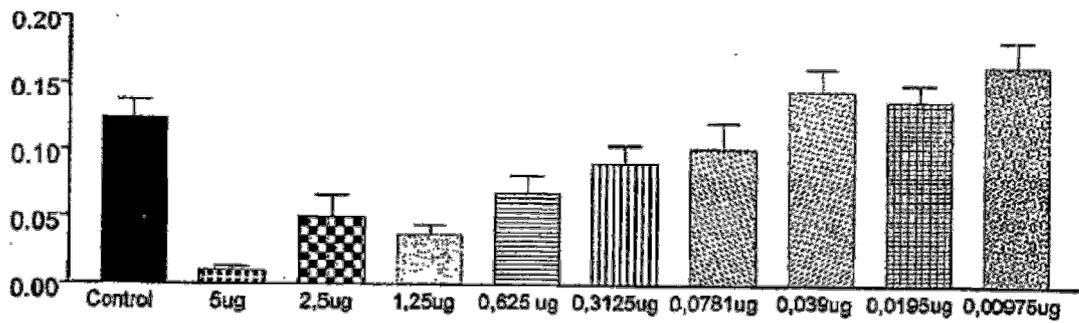


FIGURA 17

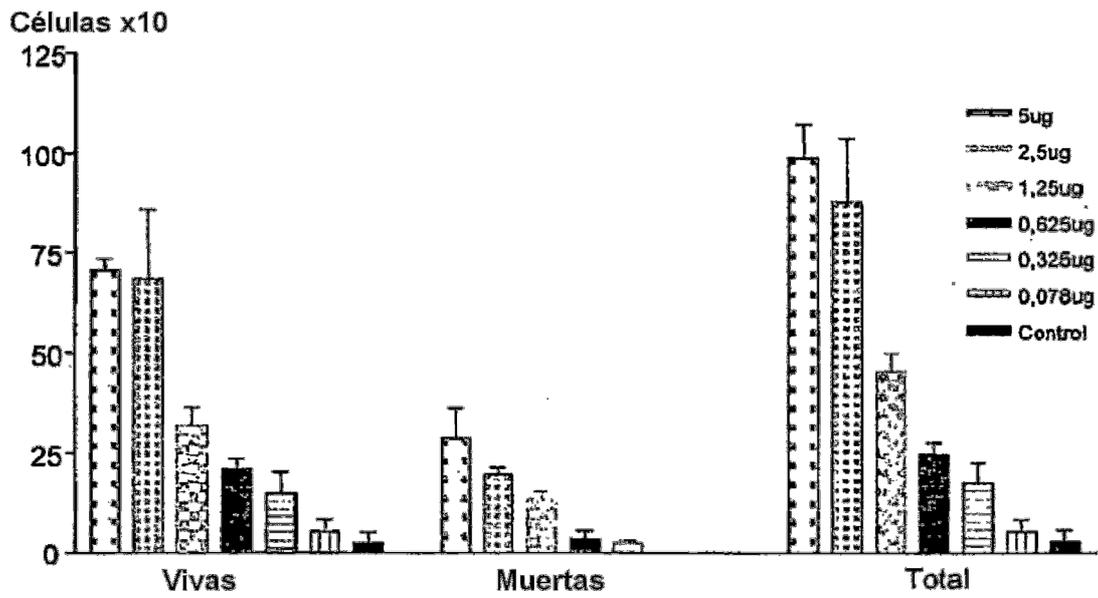


FIGURA 18

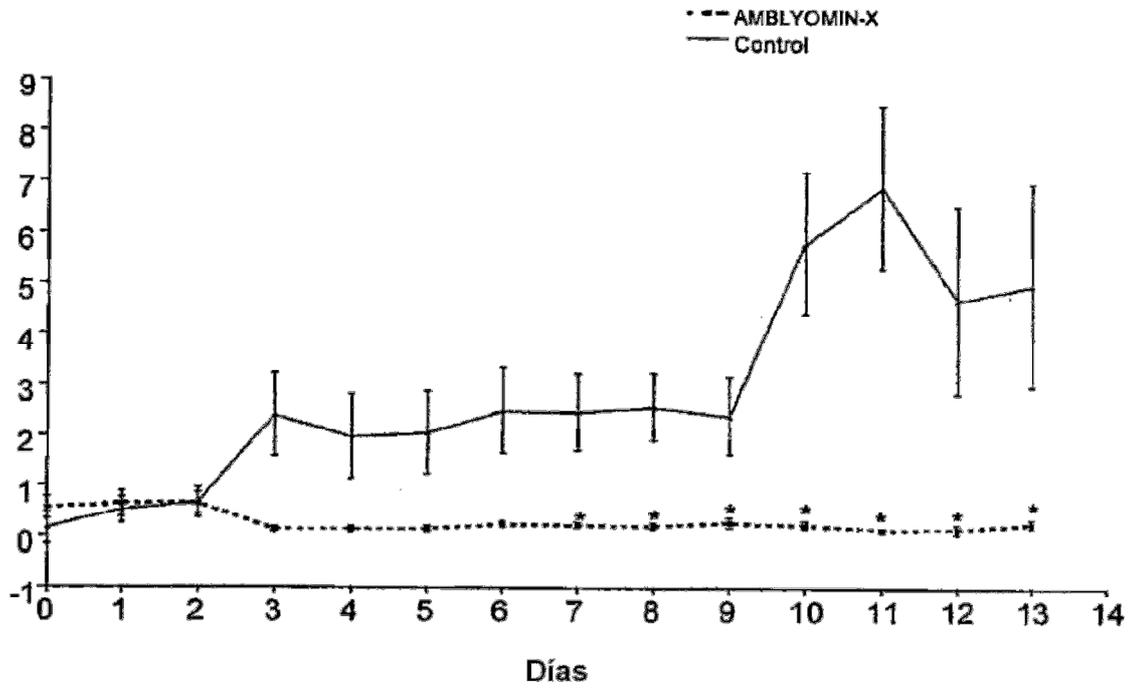


FIGURA 19

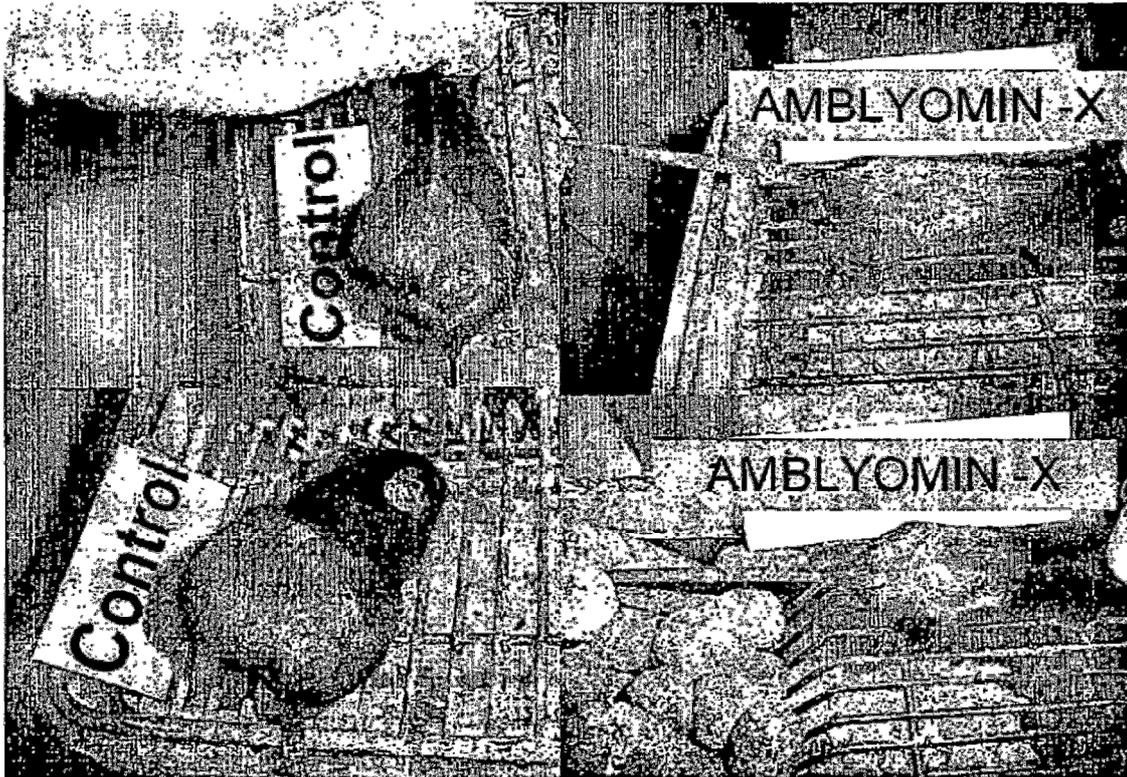


FIGURA 20

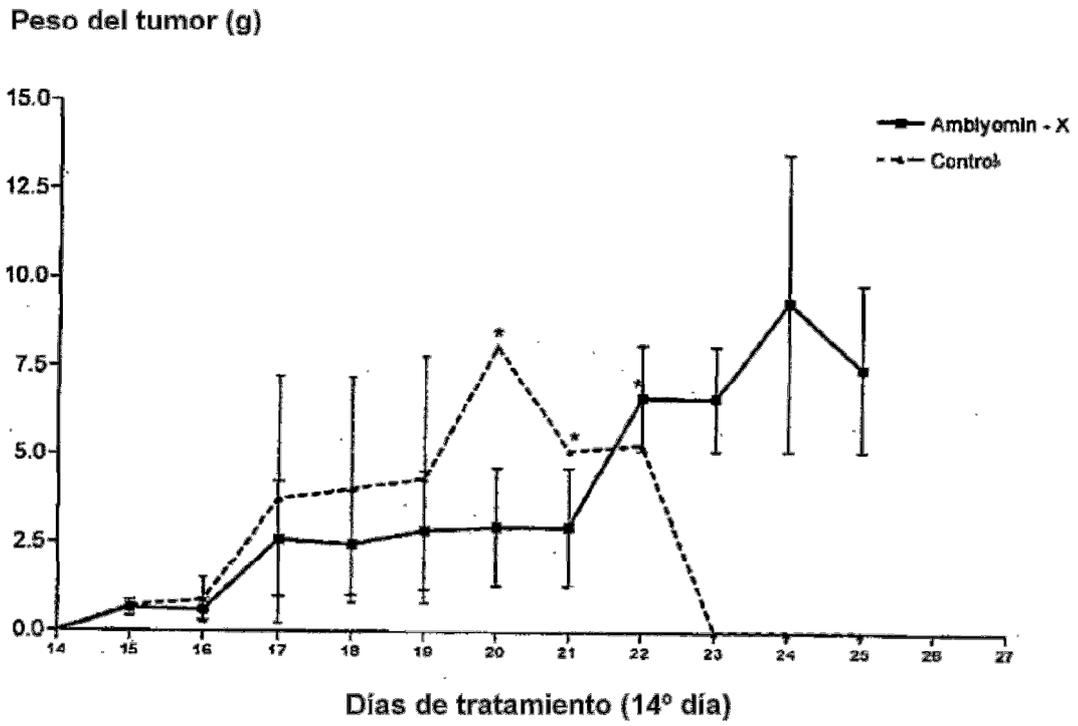


FIGURA 21

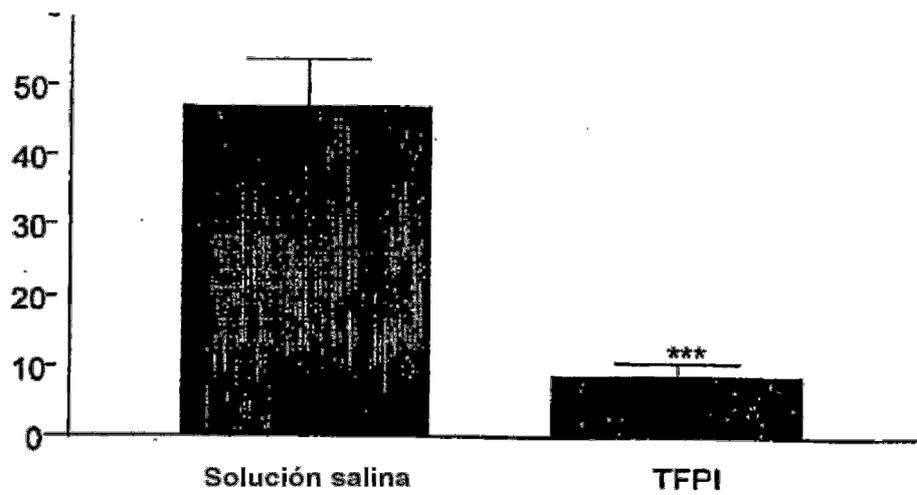


FIGURA 22

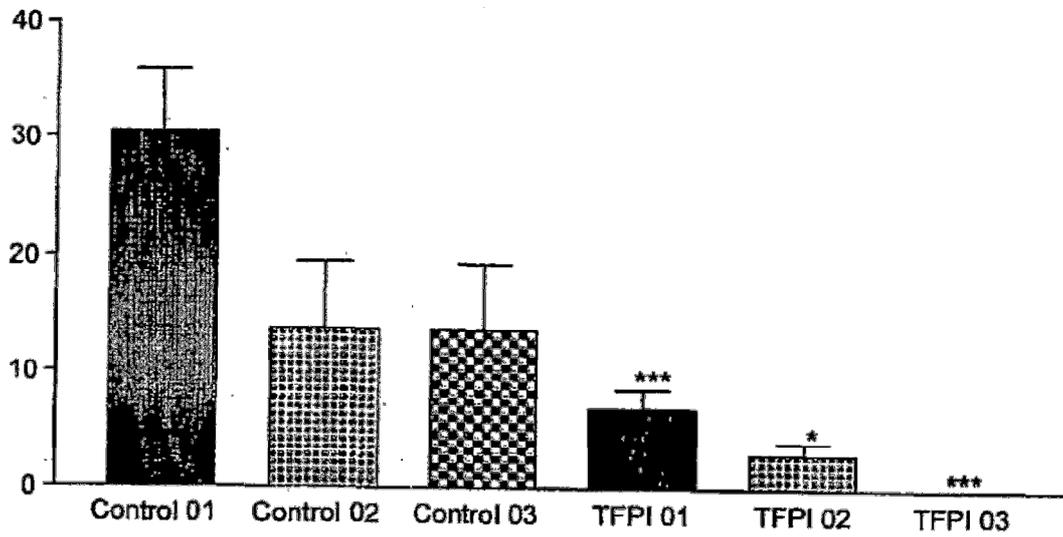


FIGURA 23

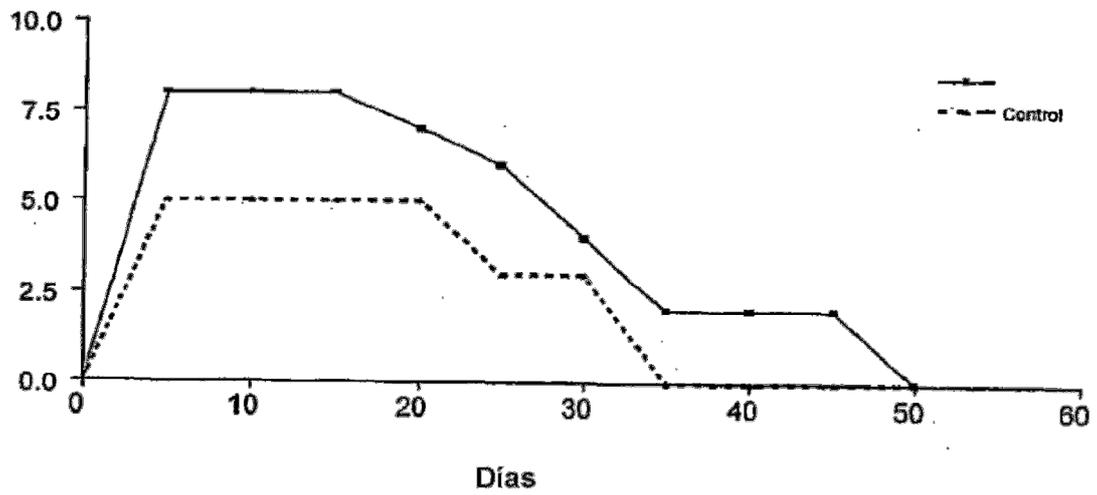


FIGURA 24

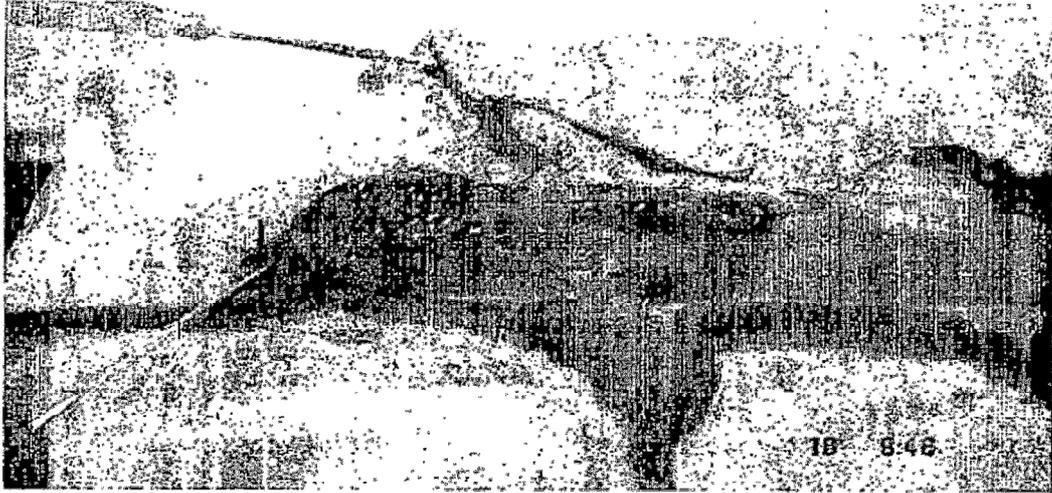


FIGURA 25

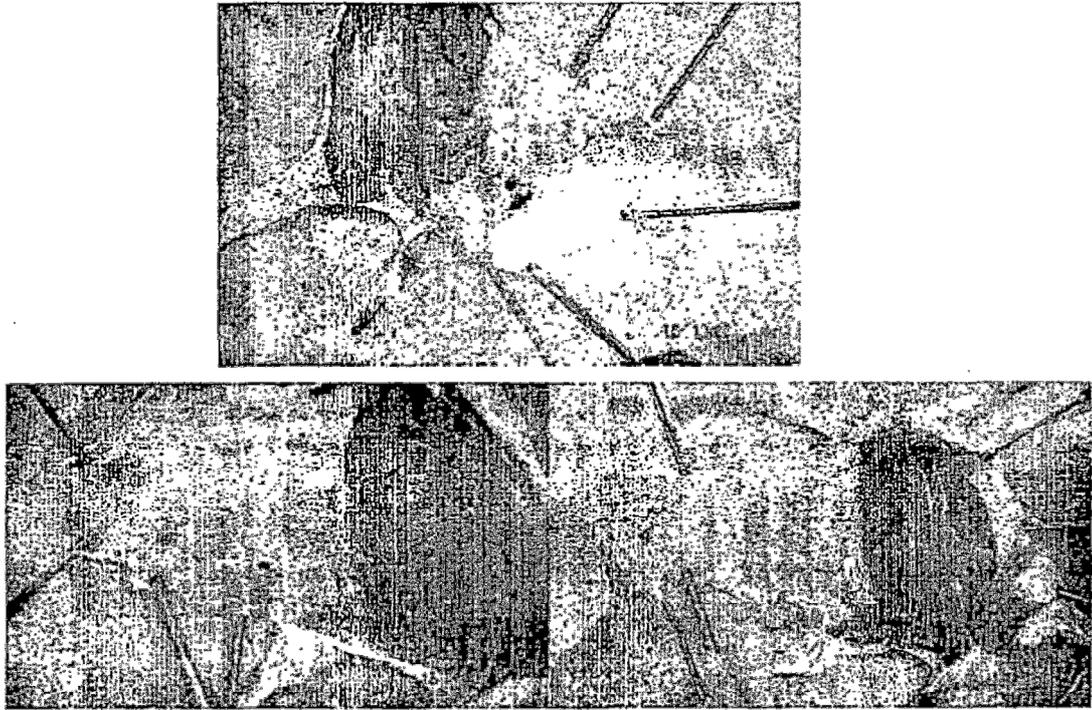


FIGURA 26

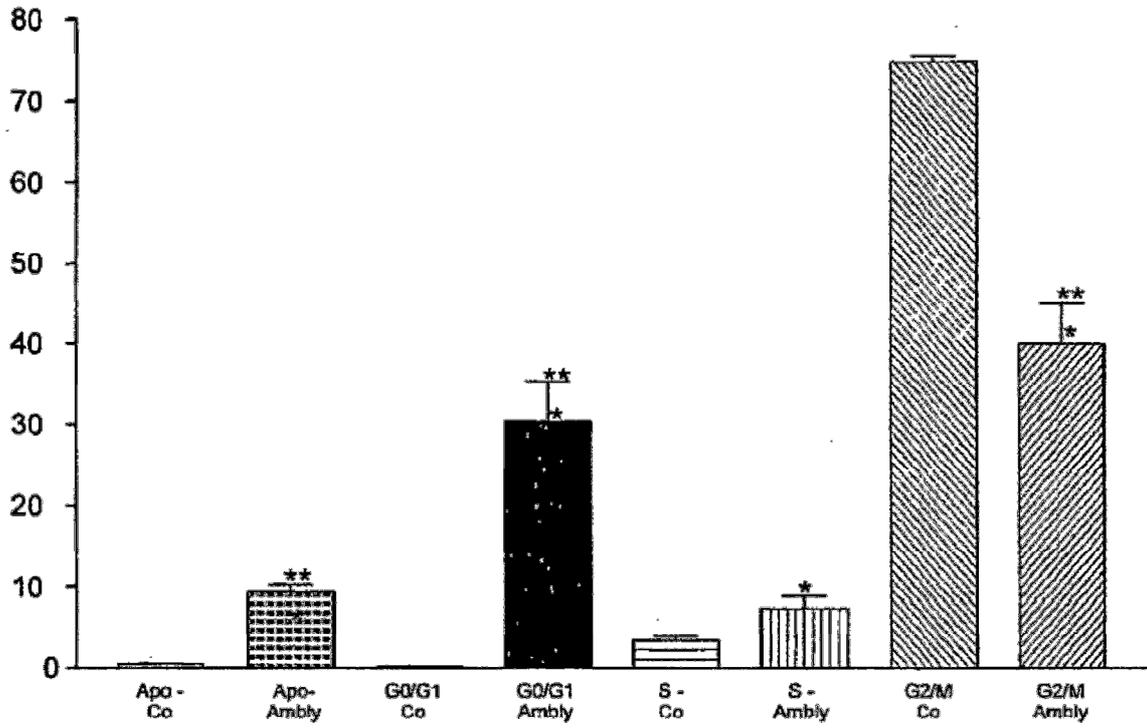


FIGURA 27

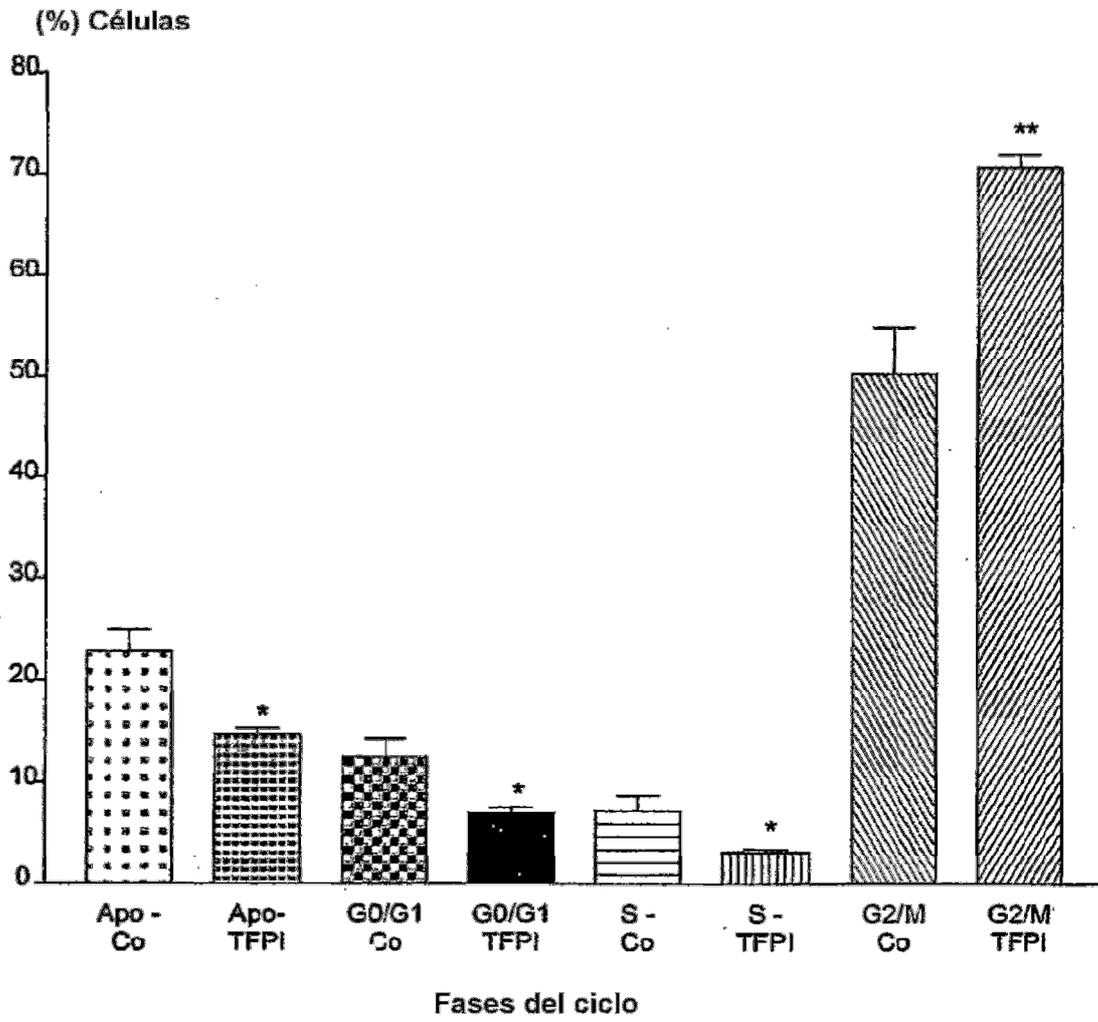


FIGURA 28

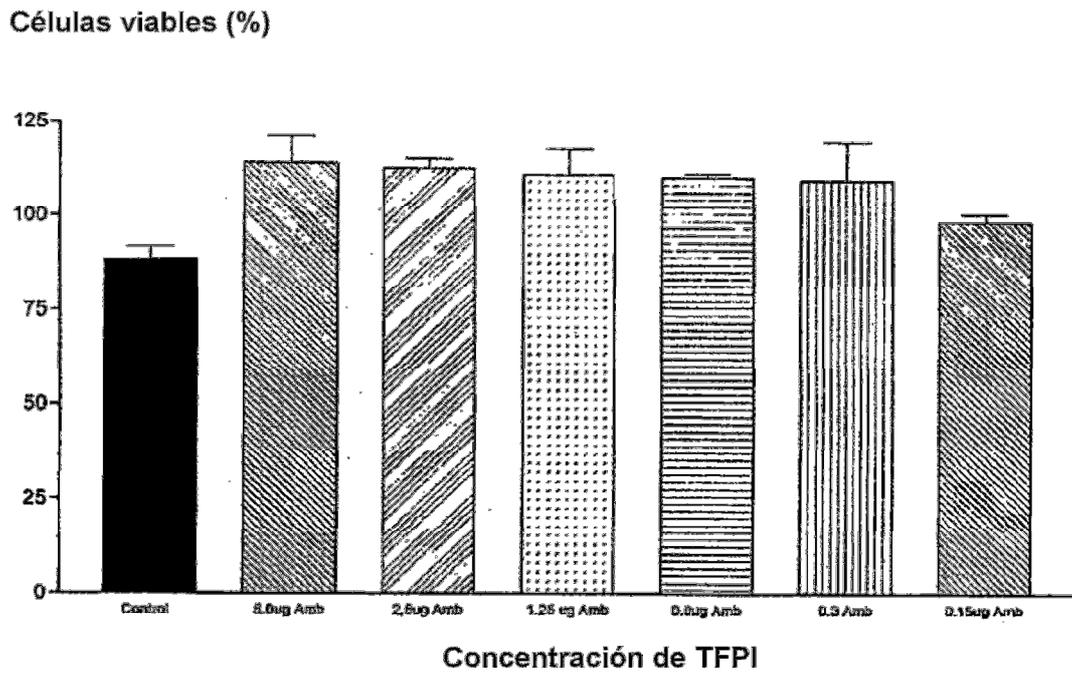


FIGURA 29A

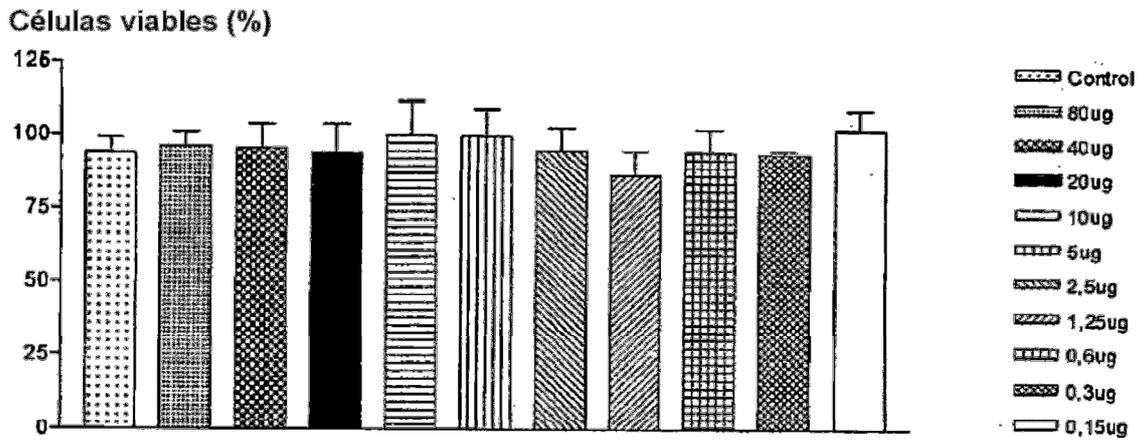


FIGURA 29 B

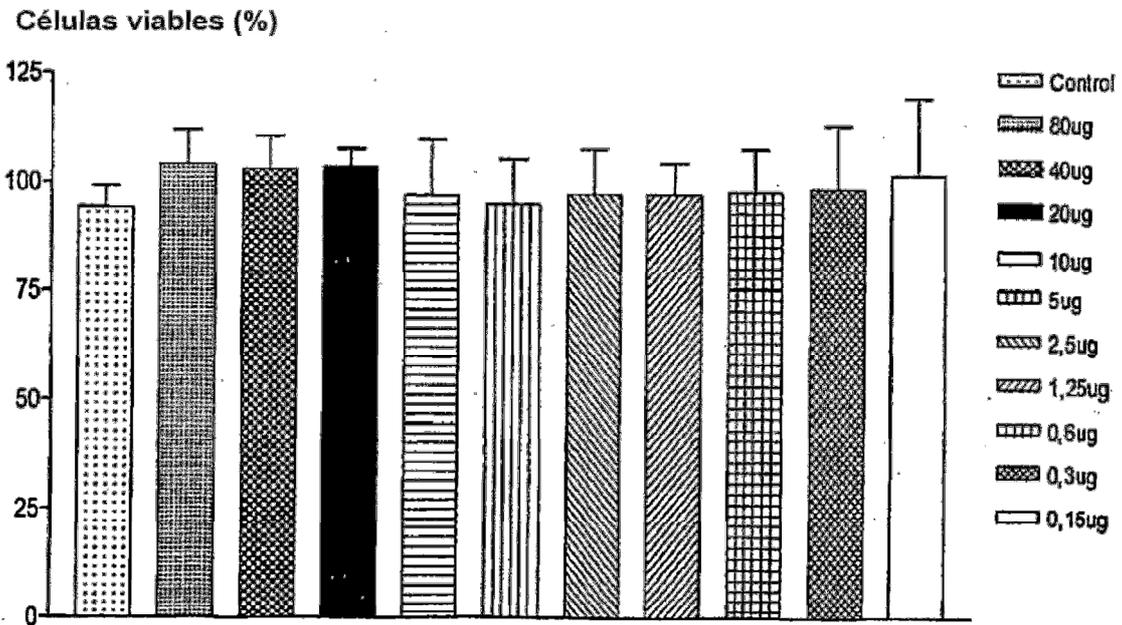


FIGURA 30

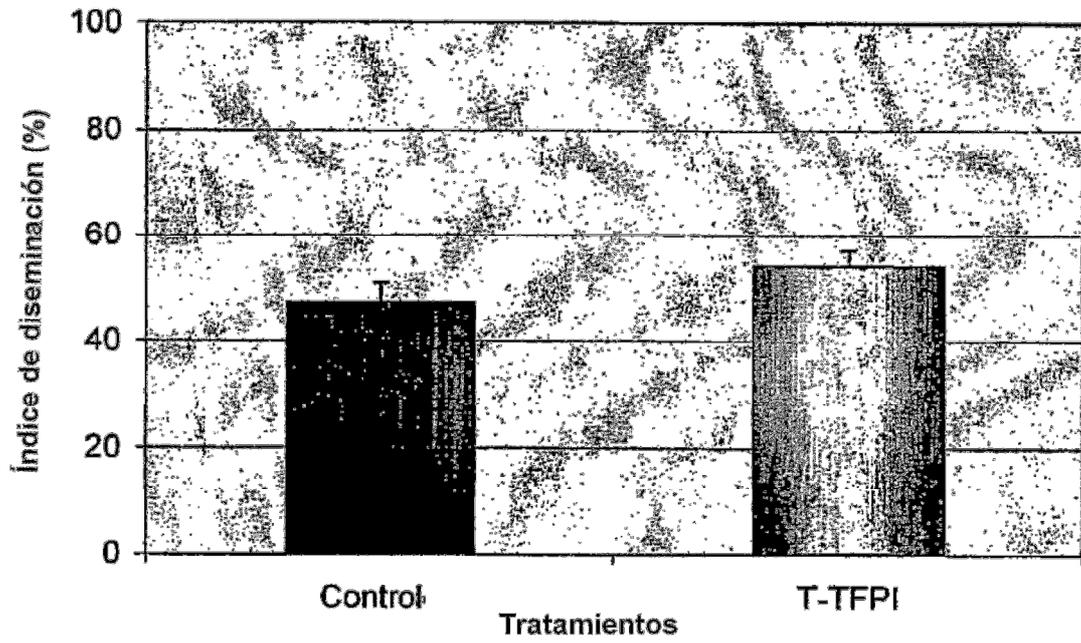


FIGURA 31

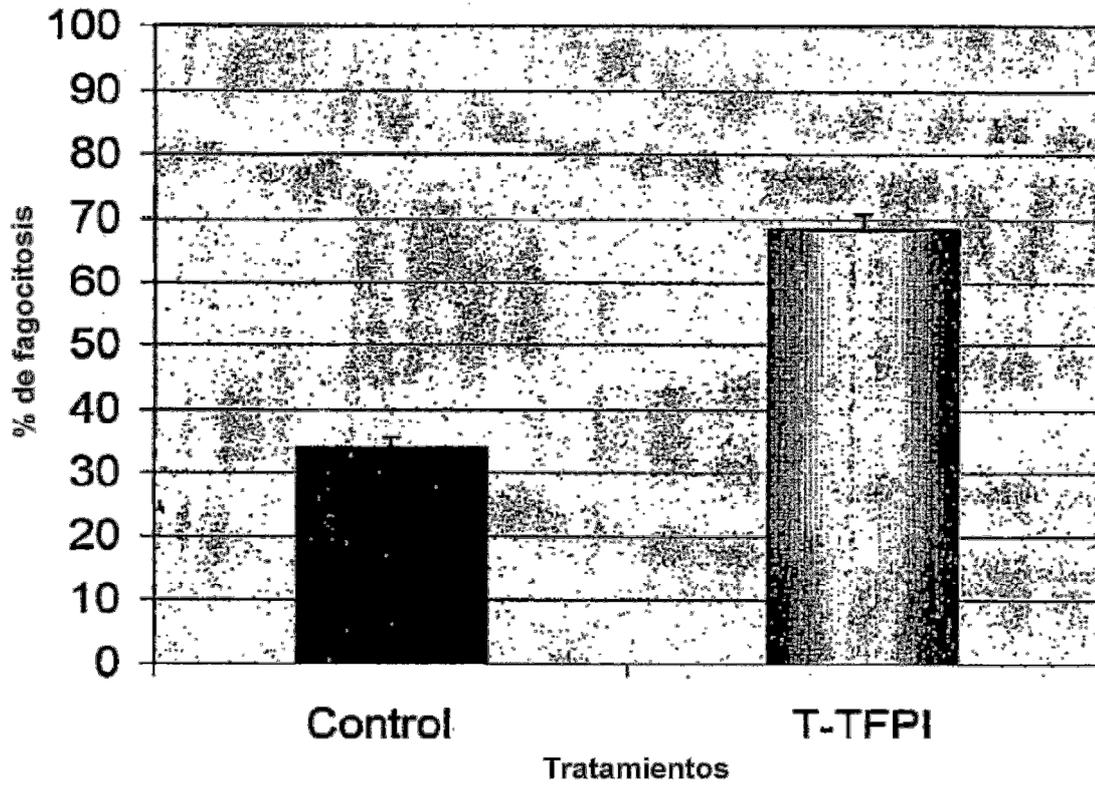


FIGURA 32

