

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 383**

51 Int. Cl.:

C07K 14/37

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2009** **PCT/IN2009/000306**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.08.2010** **WO10095143**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2009** **E 09840273 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018** **EP 2430041**

54 Título: **Lectinas recombinantes de fijación a las células cancerosas con actividad antitumoral y método de preparación**

30 Prioridad:

18.02.2009 IN 350MU2009

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

21.05.2019

73 Titular/es:

UNICHEM LABORATORIES LIMITED (50.0%)
Unichem Bhavan, Prabhat Estate, .V. Road,
Jogeshwari (West)
Mumbai - 100102, Maharashtra, IN y
KARNATAK UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

SWAMY, BALE MURUGI;
INAMDAR, SHASHIKALA RAMCHANDRA;
VENKAT, HEMALATHA;
CHACHADI, VISHWANATH BASAVARAJ;
NAGRE, NAGARAJA NARAYAN y
RAMADOSS, CANDADAI SESHADRI

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 713 383 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

Lectinas recombinantes de fijación a las células cancerosas con actividad antitumoral y método de preparación

5 ÁMBITO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con el campo de las proteínas de fijación a carbohidratos y, más concretamente, con una proteína que se fija específicamente a oligosacáridos concretos asociados con una especial importancia médica. La invención se relaciona específicamente con las lectinas, más en concreto con las lectinas fúngicas recombinantes que tienen la capacidad de reconocer a los polisacáridos de importancia clínica y su efecto antiproliferativo en las células cancerosas, con aplicaciones en el diagnóstico, tratamiento e investigación del cáncer.

CONTEXTO DE LA INVENCION

Las lectinas son proteínas o glucoproteínas que aglutinan los eritrocitos de algunos o todos los grupos sanguíneos *in vitro*. Constituyen un importante grupo de proteínas bioactivas que se encuentran en la mayor parte de organismos. Las lectinas se utilizan como herramientas para fines de diagnóstico y terapéutico en áreas sanitarias. Las lectinas también se utilizan en la purificación de las glucoproteínas, en el análisis de los oligosacáridos y en los procesos de selección celular. Las lectinas se pueden fijar reversiblemente a los monosacáridos o al grupo azúcar de las glucoproteínas, glucolípidos o polisacáridos.

Los cambios en las estructuras de los carbohidratos sobre las superficies celulares constituyen un rasgo característico durante el cáncer. Dichos cambios generan la exposición de estructuras de carbohidratos asociadas a tumores. Entre ellos, se encuentra una mayor aparición del antígeno Thomsen-Friedenreich, un disacárido Gal β 1 $\rightarrow$ 3GalNAc-O-Ser/Thr. En las células normales, este antígeno se enmascara debido a determinados azúcares, ácidos siálicos o sulfatos. Algunas de las lectinas tienen la capacidad de reconocer y fijarse específicamente a estas estructuras alteradas y ejercen diversos efectos fisiológicos como apoptosis, citotoxicidad, actividad proliferativa/antiproliferativa, metástasis, inhibición de la adherencia celular, etc. Por tanto, actualmente dichas se está considerando el uso de las lectinas como agentes de diagnóstico y terapéuticos del cáncer y también para la actividad antitumoral.

Se han aislado y caracterizado diversas lectinas procedentes de varias fuentes. Sin embargo, difieren en sus propiedades fisicoquímicas, como el tamaño molecular y las especificidades de los azúcares. También existe la caracterización de unas cuantas proteínas recombinantes. La lectina recombinante de hongo procedente de *Marasmius oreades* tiene un tamaño molecular de 33 kDa y muestra una elevada afinidad por Gal α 1, 3Gal y Gal α 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc. (R.P. Kruger et al., J.Biol.Chem., 277, 15002-15005, 2002; H.C. Winter et al. J.Biol.Chem, 277, 14996-15001, 2002, I.J. Goldstein, et al. Patente de EE. UU.: 6958321)

Se ha clonado la lectina de cacahuete que muestra afinidad por el antígeno Thomsen-Friedenreich (V. Sharma y A. Surolia, Gene [Amst], 148, 299-304, 1994) y, posteriormente, algunas mutaciones de esta proteína con una masa molecular subunitaria de ~28 kDa también se han expresado en *E. coli* (V. Sharma, M. Vijayan y A. Surolia, J.Biol.Chem., 271, 21200-21213, 1996) con algunas diferencias en su preferencia por la especificidad de los azúcares. Una lectina mucho más pequeña de masa molecular de 11,73 kDa con una elevada afinidad de fijación a la L-fucosa procedente de *Pseudomonas aeruginosa* también se ha expresado en *E. coli* como una fusión proteína-lectina amarilla fluorescente (BioTechniques, 41, 327-332, 2006).

Jonathan M. Rhodes observó que una lectina de hongo (ABL) procedente de *Agaricus bisporus* tiene actividad antiproliferativa en las células cancerosas del colon humano y efecto curativo en la psoriasis; n.º de patente de EE. UU. 5607679.

La lectina de *Sclerotium rolfsii* (SRL) purificada a partir de cuerpos escleróticos del hongo fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* presenta una especificidad de carbohidratos complejos y una especificidad hacia el antígeno TF. El antígeno TF es un oncofetal, un disacárido Gal β 1, 3GalNAc α ser/thr y se sabe que se expresa en las superficies celulares de distintos cánceres. SRL, además de fijarse al antígeno TF, también se fija a los disacáridos sialilados y sulfatados. Se ha determinado la estructura cristalina de esta lectina y su secuencia completa de aminoácidos (Demetres 2007 y Satisha 2008). Los estudios de fijación indicaron que SRL se fija a distintos tejidos cancerosos humanos y también a células cultivadas. La fijación adicional de SRL a células de colon y a células leucémicas humanas cultivadas provoca su antiproliferación y en las células de colon el efecto ha demostrado estar mediado por la inducción de la apoptosis. Sin embargo, la lectina natural purificada tiene problemas de solubilidad para su uso en diversas aplicaciones, por tanto existe la necesidad de obtener formas de esta lectina con una estabilidad mejorada para aplicaciones prácticas.

Así, la lectina tiene un enorme potencial en el área de los ensayos médicos. La aplicación inmediata pretende proporcionar determinadas lectinas con características novedosas, para que sean útiles en el campo médico y tengan propiedades mejoradas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención revela que las lectinas recombinantes presentan una especificidad hacia determinadas cadenas de azúcares que se encuentran exclusivamente en determinadas células cancerosas. La presente invención proporciona además un método de preparación de dos lectinas recombinantes (designadas como UC-SS/CSR-1803 y UC-SS/CSR-1805 o simplemente Rec-2 y Rec-3, respectivamente) expresadas en *E. coli*. El método comprende la síntesis de genes de lectina cuyas secuencias se derivan mediante modificaciones deliberadas realizadas en la secuencia original de aminoácidos de una lectina de *Sclerotium rolfsii* (Sathisha *et al.*, Amino Acids; 2008, 35, 309-320), un hongo fitopatógeno del suelo y su clonación en *E. coli*. Las lectinas recombinantes se expresan como proteínas solubles y se purifican mediante técnicas cromatográficas de filtración en gel e intercambio iónico.

La presente invención proporciona específicamente dos lectinas recombinantes (Rec-2 y Rec-3) con masas de la subunidad aproximadas (M_r 16,1 kDa), que son específicas hacia determinados polisacáridos ligados mediante enlaces O-glucosídicos que se producen en las glucoproteínas y en las superficies celulares, pero que no muestran especificidad hacia los polisacáridos ligados al nitrógeno. La propiedad de reconocer a los O-glucanos pero no a los N-glucanos y no mostrar ninguna especificidad hacia los grupos sanguíneos humanos las diferencia de otras lectinas recombinantes reveladas en la solicitud de patente también pendiente 30/MUM/2008. También se ha descubierto que las lectinas recombinantes Rec-2 y Rec-3 no se ligan a la fetuína, aunque sí muestran una afinidad muy fuerte por la asialofetuína, lo que las diferencia de la lectina recombinante mencionada (solicitud de patente 30/MUM/2008) y también de la lectina natural. Por medio de esta propiedad de reconocimiento se fijan a determinadas moléculas de la superficie celular manifestadas durante una neoplasia maligna (Fig. 1) y, por tanto, se fijan a los tejidos de cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de ovarios en humanos (Fig. 2) y también a células cultivadas y estirpes celulares leucémicas (Tabla I). Además de fijarse a células de cáncer humanas cultivadas, las lectinas recombinantes manifiestan *in vitro* una actividad antiproliferativa en las células (Tabla 2), lo que pone de manifiesto sus propiedades diagnósticas y terapéuticas.

La invención revela las secuencias de ADN de la codificación de **Rec-2** y **Rec-3** para lectinas de 141 aminoácidos de longitud en cada caso, similares a la lectina natural (lectina *S. rolfsii*), pero con unas cuantas modificaciones deliberadas sintetizadas químicamente y clonadas en *E. coli* (ID de la SEC 1.1 y ID de la SEC 2.1). Las lectinas clonadas se expresaron después de la inducción con el IPTG inductor. La proteína expresada se presentó soluble y en forma activa en cada caso. Las lectinas recombinantes se purificaron a homogeneidad esencial recurriendo al intercambio de aniones y la cromatografía de tamiz molecular. La estimación de los pesos moleculares de la espectrometría de masas y la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS PAGE) indican un valor de aproximadamente 16,1 kDa. El experimento con enfoque isoeléctrico muestra un valor de PI de 6,614 mientras que la lectina natural tiene 6,219; la propiedad ayudó de forma notable a mejorar la solubilidad y estabilidad de las proteínas recombinantes. La mejora de la solubilidad, estabilidad y fijación al antígeno TF desialilado de las lectinas recombinantes tiene mayores implicaciones que sus aplicaciones en diversos campos como reactivos, además de su facilidad de producción.

Además, en el presente se pone de manifiesto un método para preparar la lectina recombinante expresada en una célula anfitriona como *E. coli* u hongo levaduriforme. Este método se compone de la síntesis del gen de la lectina tomando como base la secuencia de aminoácidos derivada del MALDI MS/MS de la lectina de *Sclerotium rolfsii* (ID de la SEC. I), un hongo fitopatógeno del suelo y su clonación en la célula anfitriona.

Para obtener las propiedades deseadas, se modificó deliberadamente la secuencia de aminoácidos de la lectina natural y se obtuvieron lectinas recombinantes que se expresan en *E. coli*. La presente invención descubre dos lectinas recombinantes con secuencias de aminoácidos modificadas pero con estrechas semejanzas a la lectina natural con respecto a sus propiedades de fijación a los tejidos cancerosos y en células cultivadas *in vitro* y su actividad apoptótica en células cultivadas. Sin embargo, estas dos lectinas tienen una mejor solubilidad y estabilidad y mejores propiedades de especificidad de los azúcares deseadas para aplicaciones, en comparación con la lectina natural.

La lectina recombinante se expresa como una proteína soluble y se purifica mediante técnicas cromatográficas de filtración en gel e intercambio iónico.

La secuencia de aminoácidos ID de las SEC. 2 y 3 representa a dicha lectina con todas las características anteriores. La molécula de ácidos nucleicos que codifica el aminoácido en la proteína de las características anteriores también está dentro del ámbito de aplicación. La secuencia de ADN de ID de la SEC. 1.1 y 2.1 representa dichos ácidos nucleicos que codifican la lectina que tiene las características anteriores. Las secuencias también contemplan cualquier cambio en las secuencias de nucleótidos o aminoácidos, lo que incluye, a modo de ejemplo, cualquier sustitución, eliminación, adición o modificación como acetilación, nitración, glucación, sulfonación, etc., en cualquiera de las posiciones de la secuencia completa y también incluye truncamientos en el extremo 5' o 3' de las secuencias que no alteran las propiedades reveladas en la solicitud instantánea.

En un aspecto, esta lectina recombinante en una formulación biotinilada o modificada con un cromóforo fluorógeno se puede utilizar para la detección de células cancerosas o cáncer asociado a antígenos específicos.

El efecto modulador de la proliferación de la lectina recombinante puede tener una posible aplicación en el tratamiento antineoplásico como agente antitumoral.

5 En otro aspecto, la lectina recombinante puede utilizarse en el tratamiento y la investigación del cáncer.

La solicitud revela, en concreto, una secuencia de ADN (ID de las SEC. 1.1 y 2.1) de codificación para lectinas de 141 aminoácidos de longitud, similares a la lectina (*S. rolfssii*), pero con unas cuantas modificaciones, que se sintetizaron químicamente y se clonaron en *E. coli*.

10 También se ha revelado el método de producción de dicha lectina recombinante. La lectina clonada se expresa después de la inducción con el IPTG inductor.

Específicamente, la presente invención proporciona una proteína lectina que consta de una secuencia de aminoácidos de ID de la SEC. 2 o 3. La proteína lectina de la invención tiene mejores propiedades de solubilidad y estabilidad, en comparación con la lectina de ID de la SEC. 1.

15 La presente invención también proporciona la proteína lectina de la presente invención para uso en el tratamiento del cáncer y el uso de la proteína lectina de la presente invención en la detección *in vitro* de las células cancerosas.

La presente invención también proporciona la proteína lectina de la presente invención para uso en el tratamiento del cáncer y el uso de la proteína lectina de la presente invención en la detección *in vitro* de las células cancerosas.

20 La presente invención proporciona también una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína lectina de la presente invención, siendo dicha molécula de ácidos nucleicos ADN o ARN, y preferiblemente ID de la SEC. 1.1 o 2.1.

25 La presente invención también proporciona un vector recombinante que comprende, ligados operativamente en dirección 5' a 3': un promotor que funciona en una célula anfitriona; una secuencia de ácidos nucleicos estructurales de la presente invención en la que dicha secuencia de ácidos nucleicos codifica una proteína lectina; y una señal de terminación.

Además, la presente invención proporciona una célula anfitriona transformada que contiene el vector de la presente invención.

30 Es más, la presente invención proporciona un proceso para producir una proteína lectina *Sclerotium rolfssii* recombinante que consiste en: cultivar una célula anfitriona que contenga el vector recombinante de la codificación de la presente invención de la proteína lectina; expresar la proteína lectina recombinante; y aislar dicha proteína lectina del cultivo.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Perfiles comparativos de los receptores de la SRL natural aislados de las membranas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) normales humanas en reposo (1), PBMC activadas por la fitohemaglutinina (PHA) (2), Molt-4 (3) y células Jurkat (4). Las proteínas de membrana (40 µg) se resolvieron mediante SDS-PAGE (gel al 10 %) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas de interacción con SRL se investigaron con lectina biotinilada y se compararon con marcadores de proteínas de peso molecular estándar (M) después de la visualización con una reacción de estreptavidina-peroxidasa de rábano (HRP).

Figura 2: Patrón de fijación de Rec 2 y Rec 3 y de la lectina natural a tejidos cancerosos humanos de mama y ovario en comparación con la tinción hematoxilina-eosina (H & E). Las lectinas biotiniladas se utilizaron para inmunohistoquímica.

Figura 3:

50 **La secuencia de aminoácidos de la proteína lectina** aislada de *S. rolfssii* (ID de la SEC. 1); **Secuencia de proteínas de la lectina recombinante Rec 2** de la solicitud instantánea. El número de aminoácidos codificantes de esta lectina es 141 y se representan mediante ID de la SEC. 2. Las posiciones alteradas/modificadas se han resaltado en la secuencia.

Secuencia de proteínas de la lectina recombinante Rec 3 de la solicitud instantánea. El número de aminoácidos codificantes de esta lectina es 141 y se representan mediante ID de la SEC. 3. Las posiciones alteradas/modificadas se han resaltado en la secuencia.

Alineación de secuencia múltiple de ID de la SEC. 1-3.

60 **Figura 4: Una secuencia de ADN codificante de la lectina** de la solicitud instantánea, ID de las SEC. 1.1 y 2.1. La longitud de la secuencia optimizada es ---- nucleótidos, que incluye los sitios de restricción del extremo 5' Nde I (CATATG) y el extremo 3' BamHI (GGATCC). ID de la SEC.: 1.1; NOMBRE DEL GEN; UC-SS/CSR—1803 (Rec-2); ID de la SEC.: 2.1; NOMBRE DEL GEN: UC-SS/CSR-1805 (Rec-3)

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención revela genes clonados de dos nuevas variantes, designadas aquí como Rec-2 y Rec-3, en *E. coli* que están más próximos a la lectina *S. rolfssii* natural en la secuencia de aminoácidos, pero se diferencian en las cargas superficiales. Las cargas superficiales se alteraron deliberadamente para potenciar la mejor solubilidad y estabilidad de las proteínas en comparación con la lectina natural. Dos genes de lectina codificantes de la lectina *S. rolfssii* con pocas alteraciones se sintetizan y expresan químicamente en *E. coli*. Las lectinas recombinantes se purifican mediante métodos cromatográficos convencionales y sedemuestra que tienen una masa molecular aproximada de 16 000 Da. Las dos lectinas recombinantes descritas aquí son diferentes en la especificidad del grupo sanguíneo, reconocen todos los grupos sanguíneos humanos y tienen la capacidad exclusiva de reconocer el antígeno TF y sus formas crípticas. Las dos lectinas recombinantes no específicas de grupos sanguíneos se parecen más a la lectina natural de *S. rolfssii* en la fijación a los azúcares, en la fijación a las células y en aportar propiedades apoptóticas. Sin embargo, las lectinas recombinantes tienen unas mejores propiedades de estabilidad y solubilidad en comparación con la lectina nativa, lo que las convierte en ideales para diversas aplicaciones.

Las diversas aplicaciones para el uso de las lectinas recombinantes pueden ser las siguientes:

Considerando la propiedad de las células cancerosas de fijación a R1 y R2, se pueden utilizar como agentes de administración de fármacos para el tratamiento del cáncer y también pueden encontrar aplicación como herramientas de diagnóstico en la detección de patógenos microbianos/virales.

Estas lectinas recombinantes pueden utilizarse para la detección de determinadas glucoproteínas y glucoconjugados presentes en los líquidos biológicos.

Las lectinas presentan especificidad de sustrato hacia carbohidratos de la superficie celular asociados al cáncer como el antígeno TF desialilado y pueden tener aplicación como matrices de afinidad para la purificación de glucoproteínas y glucoconjugados de significación fisiológica y bioquímica que se fijan a estas lectinas recombinantes.

Las lectinas recombinantes se pueden utilizar como socios de fusión para la purificación de las lectinas recombinantes.

La invención se revelaría ahora por medio de la metodología y representaciones preferidas:

Construcción y clonación del gen de lectina:

La secuencia de aminoácidos deriva del MALDI MS/MS y los datos de la cristalografía de rayos X de la lectina purificada del hongo del suelo *Sclerotium rolfssii* formó la base de la construcción del gen. El gen correspondiente a esta secuencia ID de la SEC. 1 se sintetizó químicamente siguiendo los protocolos estándar. El gen ensamblado se introdujo primero en un vector pUC57. El inserto se liberó mediante la digestión del plásmido con NdeI y BamHI y, a continuación, se volvió a clonar en pET20b previamente digerido con NdeI y BamHI. Después de que se utilizase la unión del plásmido para transformar la cepa anfitriona *E. coli* DE3 (ORO) para la expresión. Los clones recombinantes se analizaron para la liberación del inserto tras la digestión con Nde I y Bam HI. El análisis por SDS-PAGE de *E. coli* recombinante tras la inducción con IPTG mostró la proteína de ~16 kDa prevista.

Proliferación celular

Una colonia individual de *E. coli* recombinante se inoculó en 5 ml de LB-Amp y se le permitió proliferar a 37 °C hasta el día siguiente, con agitación. El cultivo de proliferación hasta el día siguiente se inoculó en el medio de fermentación y proliferó a 37 °C hasta que se alcanzó una DO de ~2,0; los cultivos se indujeron luego con 250 µM de IPTG (concentración final) y proliferaron hasta el día siguiente a 20 °C.

Preparación de extracto celular

Los cultivos proliferados hasta el día siguiente se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min y las células sedimentadas (4 gms) se suspendieron en 40 ml de 50 mM de Tris-HCl con pH 8,0 que contenía 1 mM, PMSF e 1 mM EDTA. La suspensión celular se homogeneizó con ultrasonidos durante 20 min utilizando el homogeneizador ultrasónico. Las células se centrifugaron a 12 000 rpm, 10 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para una purificación adicional.

Purificación de la proteína

Cromatografía de dietilaminoetil (DEAE)-celulosa:

El sobrenadante (400 mg de proteína) en 50 mM de amortiguador Tris-HCl con pH 8,0 se cargó en la columna de 25 ml de dietilaminoetil (DEAE) (BIORAD) equilibrada en 50 mM de amortiguador Tris-HCl con pH 8,0. La columna se lavó con 2 volúmenes de columna de amortiguador seguidos por la elución gradual de la columna con amortiguador b que contenía 75 mM de NaCl y 200 mM de NaCl. Se realizó la elución de la lectina con amortiguador que contenía 300 mM de NaCl. Esta fracción contenía 216 mg de proteína.

Cromatografía de polietilenimina (PEI):

La elución de DEAE (216 mg) se cargó en la columna NUCLEOSIL 4000-7-PEI (250 × 10 mm), equilibrada con 50 mM de amortiguador Tris-acetato con pH 8,0. La proteína ligada se eluyó aplicando un gradiente lineal de NaCl del 0-100 % en 15 min a un caudal de 2 ml/min utilizando el sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) y la proteína eluida al 98 % B (60 mg). La proteína eluida se dializó frente al agua y se repurificó en la misma columna de PEI utilizando amortiguador de bicarbonato de amonio.

La columna de PEI se equilibró con 20 mM de amortiguador de bicarbonato de amonio con pH 8,0 y la proteína se cargó en la columna. La proteína ligada se eluyó utilizando un gradiente amortiguador de 20-500 mM de amortiguador de bicarbonato de amonio. La proteína eluida (30 mg) se dializó frente al agua, se liofilizó y se almacenó a -20 °C.

Cromatografía de filtración en gel: La purificación final de la proteína recombinante se logró mediante cromatografía de filtración en gel en Superdex G-75 equilibrado con 25 mM de solución salina amortiguada con tris (TBS), pH 7,2 en el sistema de purificación AKTA Prime plus.

La expresión de la proteína y la purificación de la proteína se comprobaron en SDS PAGE al 15 % y los resultados se ofrecen aquí. Había una banda de proteína teñible azul de Coomassie importante correspondiente a un tamaño molecular de 16 kDa.

EJEMPLOS

Estudios de solubilidad:

Las lectinas recombinantes purificadas se dializaron ampliamente frente al agua y se liofilizaron. Las muestras liofilizadas se suspendieron en amortiguadores de distinto pH, el contenido de proteína y la actividad de hemaglutinación se determinaron en el sobrenadante transparente después de la centrifugación. Las actividades de solubilidad y hemaglutinación se compararon con la lectina natural.

Estudios histoquímicos:

La fijación de las lectinas a secciones de tejido de casos confirmados de cáncer epitelial de colon humano se realizó utilizando lectinas biotiniladas y la fijación se observó mediante un microscopio de luz. Secciones de tejido se tiñeron de forma rutinaria utilizando hematoxilina y eosina y se llevaron a cabo estudios histoquímicos de la lectina mediante protocolos estándar utilizando secciones de tejido de 5 µm de tejidos cancerosos. Se obtuvieron secciones de tejidos de cáncer de colon de un grosor de 5 µm cada una, que se utilizaron para estudios histoquímicos, por medio de un micrótopo giratorio semiautomático (Leica RM 2145) y se desparafinaron calentándolas en un calentador de portaobjetos a 60 °C durante 1 h. Las secciones de tejido se rehidrataron manteniéndolas en dos cambios de xileno durante cinco minutos en cada caso, y luego se transfirieron a alcohol puro y a alcohol al 95 % durante tres minutos en cada caso. Como procedimiento de rutina para confirmar el estado de los tejidos en condición normal o cancerosa, las secciones de tejido se tiñeron con tinciones de hematoxilina y eosina (H y E). Las secciones de tejido, después de la rehidratación, se trataron con una tinción de hematoxilina basófila durante 20-25 min, seguida por una inmersión en ácido-alcohol de 1 % de HCl y las secciones de tejido se lavaron suavemente bajo agua corriente del grifo. A continuación, se realizó la contratinción de las secciones con eosina durante 2 minutos, se lavaron con agua, se secaron y se sumergieron en xileno y se montaron en DPX (Distrene 80, dibutilftalato xileno), un medio de montaje permanente no acuoso, y se observaron utilizando un microscopio de luz (Carl Zeiss Jenalumar) y se fotografiaron.

Se llevó a cabo una tinción histoquímica, utilizando lectinas biotiniladas, tal como describieron Danguy y Gabius, en Gabius and Gabius (1993). Todos los reactivos se equilibraron a temperatura ambiente antes de la tinción. En ningún momento se permitió que las secciones de tejido se secasen durante el procedimiento de tinción. El estudio también incluyó portaobjetos de control preparados mediante la exclusión de la lectina biotinilada. Para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena, después de la rehidratación, las secciones de tejido se incubaron con metanol que contenía un 0,3 % de peróxido de hidrógeno durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, las secciones se enjuagaron con agua durante 5 minutos y, a continuación, con TBST (pH 7,2) durante 5 minutos. Después de que las secciones de tejido se enjuagaran con amortiguador fosfato salino (PBS) con pH 7,2, las secciones se incubaron con un 1 % de albúmina sérica bovina (BSA) tratada con peryodato en 0,1 M de solución de PBS durante 15 min para bloquear los sitios de fijación inespecíficos mediante la BSA. Las secciones se enjuagaron a continuación con TBST durante 5 min. Las lectinas biotiniladas (20 µg/ml en PBS) se aplicaron cuidadosamente para cubrir por completo las secciones y se incubaron durante 1 h, de forma que se facilitase la fijación completa. Las secciones se enjuagaron después con TBST, durante 5 minutos. Estas secciones de tejido se incubaron a continuación con estreptavidina-HRP (dilución 1→1000) en PBS, con pH 7,2, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se enjuagaron luego con dos cambios de TBST, con pH 7,2, durante 5 minutos. Después de la conjugación estreptavidina-HRP, las secciones de tejido se desarrollaron en cromógeno DAB (diaminobenzidina)/sustrato de H₂O₂ en solución amortiguada (pH 7,5), que se preparó de acuerdo con las directrices de los fabricantes. Las secciones de tejido se incubaron durante 10 minutos y, a continuación, se enjuagaron suavemente con agua durante 5 minutos. Se permitió que los portaobjetos se secasen y se sumergieron

en xileno y se montaron en DPX. Las secciones se examinaron luego bajo un microscopio de luz (Carl Zeiss Jenalumar) para observar y estudiar los patrones de intensidad de la tinción en los tejidos normales y cancerosos y se fotografiaron.

5 **Identificación de antígenos de la superficie celular:**

Identificación de los neoglicanos expresados en linfocitos activados y transformados en comparación con los linfocitos normales mediante la lectina recombinante;

Para identificar las neoglicoproteínas expresadas en los linfocitos tras la activación mediante la PHA y células transformadas, se llevaron a cabo estudios de interacción con las respectivas proteínas de la membrana celular con lectina biotinilada.

Aislamiento de las proteínas de la membrana celular:

Los linfocitos periféricos humanos se prepararon a partir de la sangre extraída a un donante sano. La muestra de sangre (20 ml) recogida en un tubo de vidrio de centrifugadora con contenido de EDTA (concentración final de 12,5 mM) y los linfocitos normales se separaron mediante centrifugación con un gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia). Una parte de los linfocitos normales se activó mediante incubación con PHA (2,5 µg/ml de PHA) en medio RPMI-1640 suplementado con un 10 % de suero fetal de ternero (FCS) durante 72 horas en una estufa de incubación de CO₂. Las células activadas se obtuvieron mediante centrifugación y la activación se confirmó comprobando la expresión de los receptores CD25.

Linfocitos normales, linfocitos activados y estirpes celulares leucémicas; Molt-4 y Jurkat se mantuvieron finalmente en un medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con glutamina (2 mM), FCS inactivado con calor (10 %), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada (95 % aire y 5 % CO₂). Las proteínas de la membrana de estas células cultivadas se aislaron utilizando el método del "Kit de extracción de proteínas de membrana Pierce" (Mem-PER, n.º prod. 89826) y los contenidos de proteína se estimaron utilizando el Kit de estimación de proteínas DC de Bio-Rad. Las proteínas de membrana aisladas se concentraron finalmente mediante precipitación de cloroformo-metanol y las proteínas precipitadas se secaron al aire y se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior.

30 **Electroforesis e inmunoelectrotransferencia (western blotting):**

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó en presencia de SDS utilizando un sistema de minigel (Hoefer Scientific Instruments, EE. UU.) en gel al 10 % durante 60 min a 120 voltios. Las proteínas se transfirieron de geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa en un equipo de transferencia semiseca utilizando un amortiguador de transferencia (240 mM de glicina, 25 mM de tris, 0,1 % SDS) que contiene un 20 % de metanol a 75 mA durante 3 h a 4 °C. Las membranas se saturaron después de la transferencia con solución de bloqueo (3 % p-BSA) y se lavaron con TBST. La fijación de la lectina se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 4 horas con lectina acoplada a biotina a la concentración final de 20 µg/ml (preparada en TBST). Después de un lavado a fondo, la transferencia se incubó con estreptavidina-HRP (1:1000 en TBST) a temperatura ambiente durante 1 h y el exceso de estreptavidina-HRP se lavó con TBST. Por último, las bandas de lectina-glucoproteínas se visualizaron mediante desarrollo con un sistema cromogénico DAB.

Los resultados de estos hallazgos indican que la presente lectina recombinante tiene la capacidad de fijarse a algunos de los neoglicanos expresados exclusivamente en las células leucémicas y también en linfocitos activados.

45 **SDS PAGE y transferencia de lectina**

Las proteínas de muestras de líquido de quistes ováricos se separaron mediante SDS PAGE en geles al 10 % tal como describen Laemmli et al. utilizando Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, EE. UU. La electroforesis se realizó durante 70 min. utilizando 110 voltios. Inmediatamente después de la electroforesis, bandas de proteínas fraccionadas se resolvieron transfiriéndolas a una membrana de nitrocelulosa utilizando una unidad de transferencia semiseca. La membrana transferida se lavó con agua destilada y se realizó su tinción con reactivo Ponceau para confirmar la eficiencia de la transferencia y marcar la ubicación de las proteínas estándares. Por último, la transferencia se lavó con TBS con un contenido de 0,1 % de Tween-20 (TBST) y se trató con un 3 % de P-BSA en TBST hasta el día siguiente para evitar una fijación inespecífica. Después del lavado con TBST, la transferencia se incubó con lectinas biotiniladas (20 µg/ml en TBST) a 37 °C durante 4-6 horas. El exceso de lectina y la lectina no ligada se eliminaron lavando la membrana con TBST y, a continuación, las membranas se incubaron con estreptavidina-HRP (1 µg/ml en TBST) durante una hora. La estreptavidina-HRP sin ligar se eliminó mediante un lavado con TBST. Las glucoproteínas de fijación a la lectina se visualizaron mediante la tinción de la actividad de la peroxidasa utilizando el sistema DAB.

60 **Actividad proliferativa y antiproliferativa de PBMC y células leucémicas y de cáncer de colon cultivadas**

La actividad proliferativa/antiproliferativa de la SRL en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana se determinó mediante un ensayo de incorporación de timidina tritiada, usando PBMC humanas recién aisladas, tal como describen Wang et al., [1992] con algunas modificaciones. Las PBMC se aislaron de muestras de sangre recién extraídas de donantes sanos y las células se mantuvieron en un medio completo RPMI 1640, tal como se describió previamente. Las células se diluyeron con un medio RPMI con un contenido de 10 % de FCS y, a

continuación, se sembraron (1×10^5 células/50 μ l/pocillo) en microplacas de 96 pocillos (NUNC Dinamarca). Diversas concentraciones (10, 5, 2,5, 1,25 y 0,625 μ g/ml) de SRL en un medio RPMI 1640 se añadieron a cada pocillo en un volumen final de 100 μ l y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada durante 72 h. Dieciocho horas antes del período de incubación total, se añadió 1 μ Ci de timidina tritiada a cada pocillo en un volumen final de 10 μ l y la incubación continuó durante otras 18 h. Por último, las células se obtuvieron en un papel de filtro de vidrio (Amersham Biosciences) utilizando un recolector celular (NUNC, Dinamarca), se lavaron a fondo con agua destilada y se secaron en un microhorno. Los discos de filtro se transfirieron a viales de centelleo (Tarsons, India) con contenido de 600 μ l de mezcla de centelleo a base de tolueno. Por último, la timidina tritiada incorporada se midió mediante un contador de centelleo β (Packard Bioscience Ltd.) como recuentos por minuto (CPM). Para confirmar la actividad proliferativa mediada por los receptores de lectinas, los ensayos se realizaron utilizando una SRL preincubada con mucina. La SRL (10 μ g/ml) se preincubó con mucina (12,5 μ g en 100 μ l) durante 1 h a 37 °C y se utilizó para un ensayo de proliferación celular. Se incluyeron controles adecuados con contenido de células sin lectina y células solo con mucina. Los resultados son representativos de los tres experimentos independientes realizados por triplicado.

El efecto proliferativo/antiproliferativo de SRL en la estirpe celular leucémica Molt-4 se determinó mediante un ensayo de incorporación de timidina tritiada, tal como se describió anteriormente. El efecto proliferativo/antiproliferativo de SRL en la estirpe celular leucémica Molt-4 se determinó mediante un ensayo de incorporación de timidina tritiada, tal como se describió anteriormente. Se sembraron células (1×10^5 /pocillo) en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos y se permitió su aclimatación durante 3 h antes del tratamiento con lectina. Se añadieron concentraciones en serie de SRL de 6,25 μ g/ml a 100 μ g/ml en 50 μ l de medio RPMI a cada pocillo y se incubaron durante 72 h. Todos los demás pasos del ensayo se mantuvieron igual, tal como se describió anteriormente. Para el ensayo de bloqueo de la lectina, la SRL (100 μ g/ml) se preincubó con 12,5 μ g de mucina en un volumen total de 100 μ l durante 1 h a 37 °C y se utilizó para el ensayo.

Secuencias recombinantes

Las secuencias de genes y las proteínas tienen la siguiente actividad biológica: reconocer todo los grupos sanguíneos humanos y tener la capacidad exclusiva de reconocer el antígeno TF y sus formas crípticas, parecerse a la lectina natural de *S. roffsii* en la fijación a los azúcares, en la fijación celular y en aportar propiedades apoptóticas, tener mejores propiedades de estabilidad y solubilidad en comparación con la lectina natural está dentro del ámbito de la aplicación. Las moléculas de nucleótidos que codifican las moléculas recombinantes pueden ser ADN o ARN. Las proteínas de las características mencionadas anteriormente, obtenidas mediante mutaciones deliberadas o aleatorias, están cubiertas dentro del concepto de la solicitud instantánea.

La fijación de las lectinas recombinantes a diferentes células cultivadas se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Fijación de las lectinas recombinantes a células leucémicas (Molt 4 y Jurkat), ováricas (PA 1) y de colon (COLO 205) cultivadas y la inhibición de la fijación por la mucina

Estirpes celulares		% de células positivas		
		Rec 2	Rec 3	Natural
Molt 4	Lectina	84,03	99,87	88,45
	Lectina+Mucina	0,24	0,30	0,24
Jurkat	Lectina	81,35	97,85	33,84
	Lectina+Mucina	0,89	1,02	0,50
PA-1	Lectina	97,97	97,58	96,72
	Lectina+Mucina	2,5	4,28	1,63
COLO 205	Lectina	66,53	90,29	91,66
	Lectina+Mucina	0,87	1,08	0,99

En cada caso, la fijación de R2 y R3 con Molt 4, Jurkat (células leucémicas), PA-1 (células ováricas) y COLO 205 (células de colon) es superior al 90 % y la fijación se puede abolir mediante la mucina.

Como otra manifestación, se revela el efecto inmunomodulador sobre estas células cultivadas. Tanto R2 como R3 ejercen una actividad antiproliferativa sobre las células cultivadas, máximo efecto (60 %) sobre las células leucémicas en comparación con las células ováricas (50 %) y las células de colon (40 %). Su efecto modulador de la proliferación puede tener una posible aplicación en el tratamiento del cáncer (tabla 2).

Tabla 2. Actividad antiproliferativa de las lectinas recombinantes en las células cultivadas mediante el ensayo MTT

Estirpes celulares	Disminución en la viabilidad celular (%)		
	Rec 2 (25 µg/ml)	Rec 3 (25 µg/ml)	Natural (25 µg/ml)
Molt 4	60,68	61,10	57,93
PA-1	46,56	50,60	53,85
COLO-205	26,67	40,43	23,44

5 En una de las manifestaciones preferidas, la proteína lectina expresada (ID de las SEC. 2 y 3) difiere de la proteína lectina natural en términos de, al menos, una modificación/sustitución de aminoácidos en las posiciones. De estas, los cambios de posiciones se indican en la Tabla 3

10 Tabla 3. Posiciones de aminoácidos cambiadas para Rec 2 y Rec 3 en comparación con la secuencia de la lectina natural

Lectina	Posiciones de aminoácidos cambiadas				
	1	14	34	113	123
Natural	Ac-T	N	T	E	E
S1	T	D	T	Q	Q
S2	V	D	S	Q	Q

15 Las secuencias de lectina recombinantes se pueden biotinilar o se les puede adherir un cromóforo fluorogénico utilizando los métodos conocidos habitualmente para usarse en la detección de las células cancerosas o antígenos específicos asociados al cáncer. El efecto modulador de la proliferación de la lectina recombinante encuentra su aplicación en el tratamiento antineoplásico. Además, el uso de la lectina recombinante como agente de administración de fármacos para el tratamiento del cáncer se contempla en la presente solicitud.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína lectina incluye una secuencia de aminoácidos de ID de la SEC. 2 o 3, que tiene mejores propiedades de solubilidad y estabilidad en comparación con una proteína lectina de ID de la SEC. 1.
2. La proteína lectina de la aseveración 1, tiene un peso molecular de aproximadamente 16,1 kDa y un valor de PI de 6,614.
3. La proteína lectina de las aseveraciones 1 o 2 está pensada para usarse en el tratamiento antineoplásico.
4. Utilización de una proteína lectina de las aseveraciones 1 o 2 en la detección *in vitro* de las células cancerosas.
5. Una molécula de ácidos nucleicos que codifica una proteína lectina definida en las aseveraciones 1 o 2 es ADN o ARN.
6. Una molécula de ácidos nucleicos, tal como se define en la aseveración 5, es ADN de la ID de la SEC. 1.1 o 2.1.
7. Un vector recombinante que incluye, ligados operativamente en dirección 5' a 3': un promotor que funciona en una célula anfitriona; una secuencia de ácidos nucleicos estructurales, tal como se define en las aseveraciones 5 o 6, en la que dicha secuencia de ácidos nucleicos codifica una proteína lectina; y una señal de terminación.
8. Un vector recombinante de la aseveración 7 es capaz de replicarse, transcribirse, transferirse y expresarse en un organismo unicelular.
9. Un célula anfitriona transformada contiene el vector, tal como se afirma en la aseveración 7 u 8.
10. La célula anfitriona transformada de la aseveración 9 es una célula de bacteria *Escherichia coli* o una célula de hongo levaduriforme
11. El proceso para producir una proteína lectina de *Sclerotium rolfsii* recombinante incluye:
 - cultivo de una célula anfitriona que contiene el vector recombinante, tal como se define en las aseveraciones 7 o 8 codificando la proteína lectina;
 - expresión de la proteína lectina recombinante; y
 - aislamiento de dicha proteína lectina procedente del cultivo.

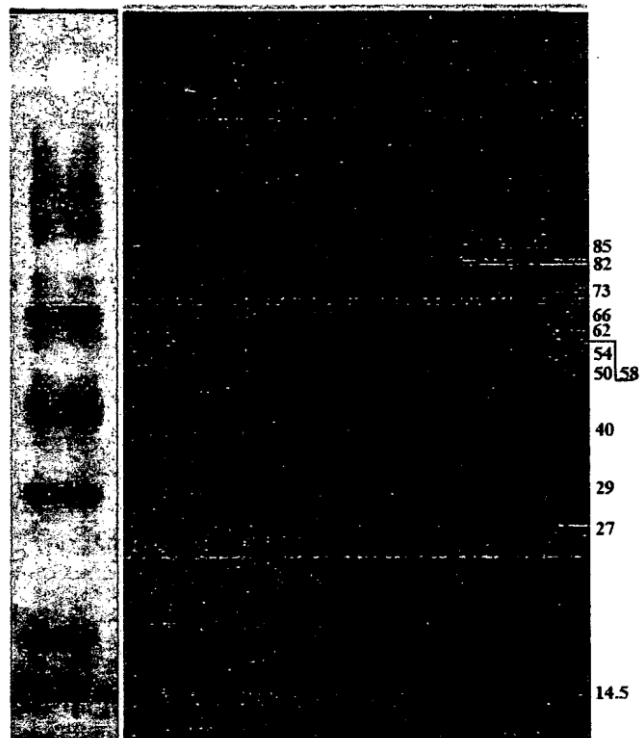


FIGURA 1

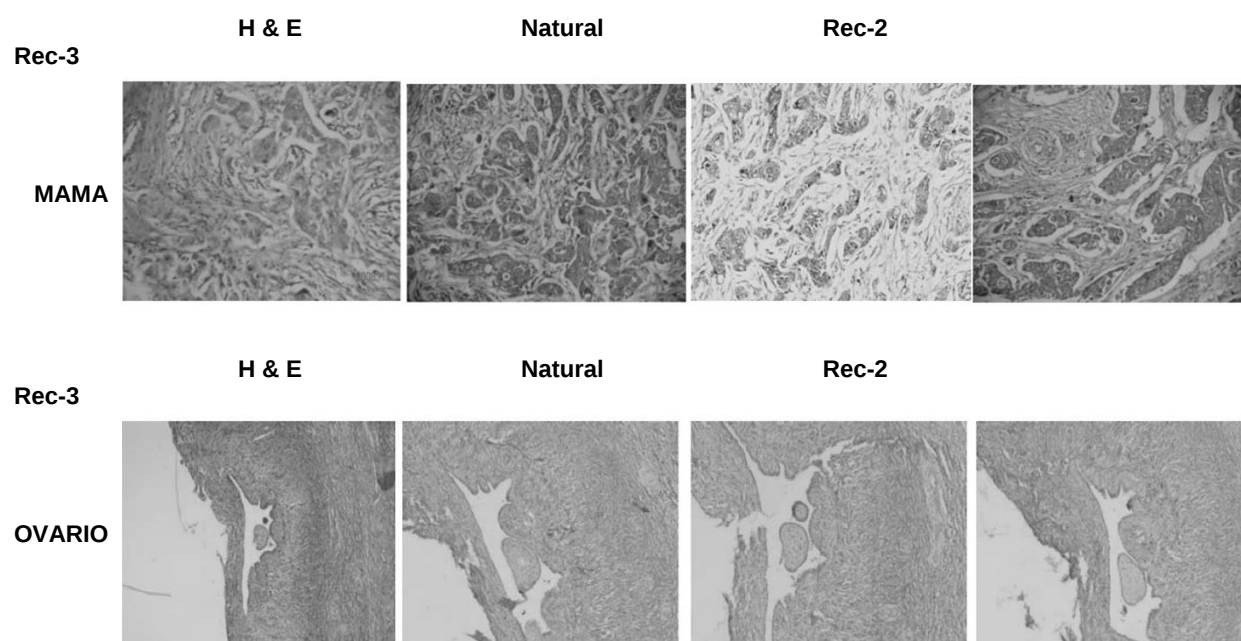


FIGURA 2

ID de la SEC.: 1 Secuencia de aminoácidos de lectina natural

Ac-TY-K-I-T-V-R-V-Y-Q-T-N-P-N-A-F-F-H-P-V-E-K-T-V-W-K-Y-A-N-G-G-T-W-T-I-T-D-D-Q-H-V-L-T-M-G-G-S-G-T-S-G-T-L-R-F-H-A-D-N-G-E-S-F-T-A-T-F-G-V-H-N-Y-K-R-W-C-D-I-V-T-N-L-A-A-D-E-T-G-M-V-I-N-Q-Q-Y-Y-S-Q-K-N-R-E-E-A-R-E-R-Q-L-S-N-Y-E-V-K-N-A-K-G-R-N-F-E-I-V-Y-T-E-A-E-G-N-D-L-H-A-N-L-I-I-G-COOH

ID de la SEC.: 2 Secuencia de aminoácidos de Rec 2

TYKITVRVYQTNPDAFFHPVEKTVWKYANGGTWTITDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHADNGESFTATFGVHNY
KRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYSQKNREEARERQLSNYQVKNAGRNFGQIVYTEAEGNDLHANLIIG

ID de la SEC. 3 Secuencia de aminoácidos de Rec 3

VYKITVRVYQTNPDAFFHPVEKTVWKYANGGTWSITDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHADNGESFTATFGVHNY
KRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYSQKNREEARERQLSNYQVKNAGRNFGQIVYTEAEGNDLHANLIIG

Comparación de las secuencias de aminoácidos de las lectinas recombinantes (Rec-2 y Rec-3) con la lectina natural (Ntv)

Ac-TYKITVRVYQTNPDAFFHPVEKTVWKYANGGTWTITDDQHVLTM	
Ntv	
TYKITVRVYQTNPDAFFHPVEKTVWKYANGGTWTITDDQHVLTM	Rec-2
VYKITVRVYQTNPDAFFHPVEKTVWKYANGGTWSITDDQHVLTM	Rec-3
GGSGTSGTLRFHADNGESFTATFGVHNYKRWCDIVTNLAADETG	Ntv
GGSGTSGTLRFHADNGESFTATFGVHNYKRWCDIVTNLAADETG	
Rec-2	
GGSGTSGTLRFHADNGESFTATFGVHNYKRWCDIVTNLAADETG	Rec-3
MVINQQYYSQKNREEARERQLSNYEVKNAGRNFEIVYTEAEGN	Ntv
MVINQQYYSQKNREEARERQLSNYQVKNAGRNFGQIVYTEAEGN	
Rec-2	
MVINQQYYSQKNREEARERQLSNYQVKNAGRNFGQIVYTEAEGN	
Rec-3	
DLHANLIIG Ntv	
DLHANLIIG Rec-2	
DLHANLIIG Rec-3	

FIGURA 3

ID de la SEC.: 1.1; NOMBRE DEL GEN; UC- SS/CSR—1803 (Rec-2)

CATATGACCTATAAAATTACCGTGCGCGTGTATCAGACCAACCCGGATGCCTTTTTCCATCCGGTGGAAAAAACC
GTGTGGAAATATGCGAATGGCGGTACCTGGACGATTACGGATGATCAGCATGTGCTGACGATGGGTGGTAGCG
GTACCAGCGGCACCCTGCGTTTTACGCGAGATAATGGCGAAAAGCTTCACCGCCACCTTTGGTGTGCATAATTAT
AAACGCTGGTGTGATATTGTGACCAACCTGGCAGCGGATGAAACCGGCATGGTTATTAATCAGCAGTATTATAGT
CAGAAAAACCGCGAAGAAGCGCGTGAACGCCAGCTGAGTAACTATCAGGTGAAAAATGCGAAA
GGCCGTAACCTCCAGATTGTTTATACCGAAGCGGAAGGCAATGATCTGCATGCGAACCTGATTATCGGCTAAGG
ATCC

ID de la SEC.: 2.1; NOMBRE DEL GEN: UC-SS/CSR-1805 (Rec-3)

CATATGGTGTATAAAATTACCGTGCGCGTGTATCAGACCAACCCGGATGCCTTTTTCCATCCGGTGGAAAAAACC
GTGTGGAAATATGCGAATGGCGGTACCTGGTCTATTACGGATGATCAGCATGTGCTGACGATGGGTGGTAGCG
GTACCAGCGGCACCCTGCGTTTTACGCGAGATAATGGCGAAAAGCTTCACCGCCACCTTTGGTGTGCATAATTAT
AAACGCTGGTGTGATATTGTGACCAACCTGGCAGCGGATGAAACCGGCATGGTTATTAATCAGCAGTATTATAGT
CAGAAAAACCGCGAAGAAGCGCGTGAACGCCAGCTGAGTAACTATCAGGTGAAAAATGCGAAAGGCCGTAACCT
CCAGATTGTTTATACCGAAGCGGAAGGCAATGATCTGCATGCGAACCTGATTATCGGCTAAGGATCC

FIGURA 4